



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Caracterización del sistema inmune innato de la
cavidad peritoneal
Papel en la defensa frente a infecciones
bacterianas intraperitoneales**

Tesis Doctoral

Laura Hernández Villarrubia

Madrid, 2019



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Caracterización del sistema inmune innato de la cavidad peritoneal. Papel en la defensa frente a infecciones bacterianas intraperitoneales

Tesis Doctoral

Laura Hernández Villarrubia, Graduada en Biología

Director: Prof. Dr. Carlos Ardavín Castro

Co-directora: Dra. María López-Bravo Arancibia

Tutora: Susana Cadenas Álvarez

Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)

Madrid, 2019

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

El Prof. Dr. D. Carlos Ardavín Castro y la Dra. Dña. María López-Bravo Arancibia

CERTIFICAN:

Que **Dña. Laura Hernández Villarrubia** ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado "Caracterización del sistema inmune innato de la cavidad peritoneal. Papel en la defensa frente a infecciones bacterianas intraperitoneales " con el objetivo de obtener el **Grado de Doctor**.

Y para que conste a todos los efectos, firma el presente certificado.

Fdo.:

Prof. Dr. D. Carlos Ardavín Castro

Dra. Dña María López-Bravo Arancibia

Madrid, año 2019

Este trabajo ha sido llevado a cabo en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) en Madrid, bajo la dirección del Prof. Dr. Carlos Ardavín Castro y de la Dra. María López-Bravo Arancibia.

A mis padres
y a mi pequeña María

ÍNDICE

RESUMEN.....	17
CLAVE DE ABREVIATURAS.....	23
INTRODUCCIÓN.....	27
1. CAVIDAD PERITONEAL.....	27
2. EL MESOTELIO PERITONEAL.....	27
2.1. La célula mesotelial.....	27
2.2. Funciones del mesotelio.....	28
• Respuesta mesotelial frente a infecciones en la cavidad peritoneal.....	29
• Interacción entre las células mesoteliales y las células neoplásicas durante la metástasis peritoneal.....	29
3. CÉLULAS INMUNES DE LA CAVIDAD PERITONEAL.....	30
3.1. Células B1.....	30
3.2. Macrófagos peritoneales.....	30
• SPMs (small peritoneal macrophages).....	31
• LPMs (large peritoneal macrophages).....	31
<i>Origen.....</i>	31
<i>Función de los LPMs durante condiciones homeostáticas.....</i>	32
4. OMENTO.....	33
4.1. Estructura.....	33
4.2. Función.....	35
5. RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE DE LA CAVIDAD PERITONEAL FRENTE A INFECCIONES.....	35
6. SEPSIS.....	37

OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. MATERIALES BIOLÓGICOS.....	47
1.1. Ratones.....	47
1.2. <i>Escherichia coli</i>	47
2. REACTIVOS.....	47
2.1. Medios de cultivo.....	47
2.2. Anticuerpos.....	47
2.3. Sondas fluorescentes.....	47
3. METODOLOGÍA.....	48
3.1. Preparaciones celulares obtenidas mediante lavado peritoneal.....	48
3.2. Suspensiones celulares de omento.....	48
3.3. Bloqueo del reclutamiento de neutrófilos.....	48
3.4. Administración de clodronato encapsulado en liposomas.....	48
4. MODELOS DE INFECCIÓN INTRAPERITONEAL.....	49
4.1. Infección intraperitoneal con <i>Escherichia coli</i>	49
4.2. Transferencia intraperitoneal de contenido fecal.....	49
5. ENSAYOS EX VIVO.....	49
5.1. Análisis de la carga bacteriana.....	49
5.2. Transferencia de células de lavado peritoneal marcadas fluorescentemente.....	49
5.3. Cuantificación de la bacteria internalizada en muestras de lavado peritoneal citocentrifugadas.....	49
5.4. Extracción LPMs adheridos a la superficie del mesotelio visceral.....	50
5.5. Aislamiento y posterior análisis de los agregados mediante citometría de flujo.....	50
6. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA MEDIANTE ELECTROPORACIÓN.....	50
7. HISTOLOGÍA.....	50

8. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	51
8.1. Marcaje en superficie.....	51
8.2. Marcaje intracelular.....	51
9. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS SÉRICAS INDICATIVAS DE DAÑO TISULAR.....	51
10. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	52
10.1. Inmunofluorescencia de tejido completo (whole mount immunofluorescence).....	52
RESULTADOS.....	56
PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES EN EL CONTROL TEMPRANO DE LA INFECCIÓN POR <i>E. COLI</i>.....	56
La infección intraperitoneal con <i>E. coli</i> induce un proceso de sepsis.....	56
Caracterización de las principales poblaciones de células inmunes presentes en la cavidad peritoneal durante los primeros estadios de la infección bacteriana por <i>E. coli</i>	56
El control temprano de la infección bacteriana en la cavidad peritoneal está regulado por la población de LPMs.....	59
Caracterización del proceso de desaparición de los LPMs durante la infección intraperitoneal con <i>E. coli</i> (MDR).....	61
LA INFECCIÓN INTRAPERITONEAL CON <i>E. COLI</i> INDUCE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE MACRÓFAGOS SOBRE LA SUPERFICIE DE LA PARED PERITONEAL.....	64
La reacción de desaparición de los macrófagos (MDR) responde a la adhesión de los LPMs al mesotelio peritoneal.....	63
Los acúmulos multicelulares formados sobre la pared peritoneal durante la infección bacteriana desestabilizan la barrera.....	65
El fenómeno de MDR es independiente del reclutamiento de monocitos y neutrófilos a la cavidad peritoneal.....	68
ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE MACRÓFAGOS SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS ÓRGANOS PERITONEALES EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR <i>E. COLI</i>.....	71
La infección intraperitoneal con <i>E. coli</i> induce la formación de agregados de LPMs en el omento.....	71
El fenómeno de MDR provocado por la infección bacteriana responde a la formación de agregados de LPMs en diversos órganos de la cavidad peritoneal.....	76

Análisis del fenómeno de MDR y la consecutiva formación de agregados de LPMs en otros modelos de sepsis intraperitoneal.....	76
La desestabilización del mesotelio durante la infección bacteriana depende de la presencia de LPMs en la cavidad peritoneal.....	77
ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS AGREGADOS DE MACRÓFAGOS SOBRE LA PARED PERITONEAL DURANTE LA FASE DE RESOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN BACTERIANA.....	82
DISCUSIÓN.....	90
PAPEL DE LOS LPMS EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN INTRAPERITONEAL CON <i>E. COLI</i>.....	90
EL FENÓMENO DE MDR RESPONDE A LA ADHESIÓN TRANSITORIA DE LOS LPMS AL MESOTELIO VISCERAL Y PARIETAL.....	92
LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE MACRÓFAGOS DURANTE LA INFECCIÓN BACTERIANA ALTERA LA BARRERA MESOTELIAL.....	94
CONCLUSIONES.....	101
BIBLIOGRAFÍA.....	104
ANEXOS.....	114
Tabla 1. Expresión diferencial de marcadores fenotípicos en LPMs y SPMs.....	114
Tabla 2A. Listado de anticuerpos utilizados para citometría de flujo.....	115
Tabla 2B. Listado de anticuerpos utilizados para microscopía confocal.....	115

RESUMEN

Peritoneal sepsis is one of the most challenging pathologies, associated with significant mortality rates, in developed countries. The peritoneal cavity is exposed to several aggressions which disrupt the integrity of the gastrointestinal wall, leading to bacterial dissemination through the peritoneal cavity. This local infection generally spreads to the periphery leading to sepsis, a systemic inflammatory response that, unless controlled by the immune system, or treated therapeutically, leads to a life-threatening clinical syndrome. In our experimental model based on the intraperitoneal injection of *Escherichia coli*, we demonstrate that LPMs, resident peritoneal macrophages, fulfilled an efficient clearance of *E. coli* during the first minutes p.i. The massive bacterial clearance fulfilled by LPMs during the first hours post infection (p.i.) contributed significantly to the dramatic reduction in bacterial load detected in the peritoneal cavity. Bacterial internalization by LPMs was concomitant with their adhesion to the mesothelium, an epithelium which covers the entire luminal surface of the peritoneal wall and also the abdominal organs, leading to the formation of macrophage aggregates. Macrophage aggregates were complex, multilayered structures, lying over the mesothelial cells, and composed primarily of LPMs, B1 cells and neutrophils, and also of a small proportion of mast cells, T cells and platelets. Macrophage aggregates, formed over the peritoneal wall, disorganize the tight junctions between mesothelial cells, leading to the formation of discontinuities. These mesothelial alterations facilitate submesothelial infiltration by LPMs and monocyte-derived inflammatory macrophages, exacerbating the mesothelial disorganization. During the resolution phase of *E. coli* infection, macrophage aggregates and submesothelial cell infiltration progressively disappeared, whereas mesothelial barrier integrity seemed not to be restored after the alterations observed during the acute phase of the infection. Because mesothelium acts as the first line of defense of the peritoneal cavity, this residual tissue damage observed during *E. coli* infection could be implicated in enhanced susceptibility to secondary infections and tumor cell implantation.

La sepsis peritoneal es una de las patologías con mayor morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. La entrada de patógenos a la cavidad peritoneal se produce cuando la barrera física que limita el peritoneo resulta dañada, causando una infección en el espacio peritoneal que, de no ser controlada localmente por el sistema inmune, se disemina al resto del organismo, iniciando un cuadro clínico de sepsis. Por ello, el sistema inmune de la cavidad peritoneal desempeña un papel fundamental en el control local de la infección, evitando con ello los daños colaterales de la diseminación sistémica del patógeno. En este trabajo describimos, utilizando un modelo de infección peritoneal con la cepa M6L4 de *E. coli*, que los LPMs, macrófagos peritoneales residentes de la cavidad peritoneal, actúan como primera línea de defensa del sistema inmune innato de la cavidad peritoneal, controlando la infección bacteriana durante los primeros minutos tras la infección. La internalización de *E. coli* por los LPMs es concomitante con su adhesión al mesotelio que recubre tanto la pared peritoneal, como los órganos abdominales. Esta adhesión resulta en la formación de agregados de macrófagos, estructuras complejas y multiestratificadas, que están principalmente formadas por LPMs, células B1 y neutrófilos, siendo también detectable un número bajo de células T, mastocitos y plaquetas. En la pared peritoneal, la formación de los agregados desestabiliza las uniones estrechas que anclan eficazmente a las células mesoteliales entre sí, provocando la formación de discontinuidades en la barrera mesotelial. Estas discontinuidades, a lo largo de los primeros días postinfección, facilitan la invasión del estroma submesotelial por los LPMs y por macrófagos inflamatorios derivados de monocitos, infiltrado que agrava la desorganización mesotelial. Durante la resolución de la infección, los agregados de macrófagos y la infiltración submesotelial desaparecen progresivamente; sin embargo, el mesotelio peritoneal presenta zonas en las que lesiones provocadas por la infiltración de LPMs y células inflamatorias no han sido completamente reparadas, resultando en un daño residual en esta barrera que limita y protege la cavidad peritoneal, lo podría conferir una mayor susceptibilidad ante infecciones subsecuentes o facilitar la implantación tumoral.

CLAVE DE ABREVIATURAS

CLAVES DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico	MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad de tipo II
ALT: Alanina aminotransferasa	MS: <i>milky spots</i>
APC: Alofococianina	NET: trampas extracelulares de neutrófilos
APC-Cy7: Alofococianina cianina 7	NK: Célula <i>natural killer</i>
ARG1: Arginasa de tipo 1	NKT: Células T <i>natural killer</i>
ARN: Ácido ribonucleico	NLR : Receptores tipo <i>NOD</i>
AST: Aspartato aminotransferasa	NOD: Dominio de oligomerización de nucleótidos
BSA: Albúmina de suero bovino	P.i.: Postinfección
BV: Brilliant™ Violet	PAMP: Patrón molecular asociado a patógenos
C. isotipo: Control de isotipo	PB: Pacific Blue®
CCL: Ligando de quimioquinas	PBS: Tampón fosfato salino
CCR: Receptor de quimioquinas	PE: Ficoeritrina
CD: <i>Cluster</i> de diferenciación	PE-Cy7: Ficoeritrina-Cianina 7
CD206: Receptor de manosa	PerCP: Peridina de clorofila
CFSE: Sonda fluorescente Vybrant™ CFDA-SE	PNAd: Adresina de ganglio periférico
CK: Creatina quinasa	PRR: Receptor de reconocimiento de patrones
CLP: Ligamento y punción del ciego	ROS: Especies reactivas de oxígeno
CLR: Receptores de lectina de tipo C	RPM: revoluciones por minuto
DC: Célula dendrítica	SPMs: Macrófagos peritoneales pequeños
E. coli: <i>Escherichia coli</i>	TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta
EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético	TLR: Receptores <i>toll-like</i>
FALCs: Agrupaciones de linfocitos asociadas a tejido adiposo	UFCs: Unidades formadoras de colonias
FBS: Suero bovino fetal	VCAM: Molécula de adhesión vascular
FCT: Transferencia de contenido fecal	WMI: <i>Whole mount immunofluorescence</i>
FITC: Isotiocianato de fluoresceína	WT1: <i>Wilms' tumor protein 1</i>
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos	
H2B: Histona 2B	
I.p.: Inoculación vía intraperitoneal	
I.v.: Inoculación vía intravenosa	
ICAM: Molécula de adhesión intercelular	
Ig: Inmunoglobulina	
IL: Interleucina	
LB: Medio <i>Luria-Bertani</i>	
LDH: Lactato deshidrogenasa	
LPMS: Macrófagos peritoneales grandes	
LPS: Lipopolisacárido bacteriano	
mAbs: Anticuerpos monoclonales	
M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos	
MDR: Reacción de desaparición de macrófagos	

INTRODUCCIÓN

1. CAVIDAD PERITONEAL

La cavidad peritoneal es la cavidad corporal de mayor extensión del cuerpo humano, por delante de la cavidad pleural y pericárdica. Se trata de un espacio anatómico cerrado delineado por el peritoneo parietal, que reviste la cara interna de la pared abdominal, y el peritoneo visceral, que cubre los órganos abdominales. En condiciones fisiológicas, la cavidad peritoneal es un espacio virtual que está ocupado prácticamente al completo por los órganos abdominales, y que está bañado por un fluido que facilita el movimiento sin fricción de las vísceras. Así, el espacio disponible entre los órganos abdominales y la pared peritoneal es únicamente aparente en condiciones patológicas, bien por la presencia de líquido (ascitis) o por el desarrollo de masas tumorales (Solass et al., 2016; van Baal et al., 2017).

La cavidad peritoneal está dividida en diferentes zonas o espacios conectados entre sí, que juegan un papel importante en la circulación del fluido intraperitoneal y en la diseminación de agentes infecciosos. La anatomía de estos espacios peritoneales está determinada por diferentes pliegues parietales, como son los ligamentos peritoneales, anclajes membranosos que permiten el mantenimiento de la estructura de los órganos abdominales, gracias al anclaje de estos a la pared de la cavidad peritoneal (Solass et al., 2016; van Baal et al., 2017). El fluido peritoneal es una fina capa de líquido (entre 50-100 ml de volumen en el cuerpo humano) que separa y lubrica el peritoneo visceral y parietal (Blackburn and Stanton, 2014). El fluido peritoneal contiene agua, electrolitos, solutos y proteínas vinculadas con el sistema inmunitario como péptidos antimicrobianos y proteínas del sistema del complemento (Isaza-Restrepo et al., 2018). El fluido peritoneal sigue un patrón de circulación intra-abdominal específico, en el que los movimientos respiratorios favorecen el flujo constante del fluido desde el abdomen inferior hacia abdomen superior y, tras ello, su retorno a favor de la gravedad, hacia la zona inferior del abdomen (Isaza-Restrepo et al., 2018).

El drenaje linfático del fluido presente en la cavidad peritoneal se produce mayoritariamente a través de aberturas presentes en el mesotelio cuboidal que recubre el diafragma. Estas estructuras, denominadas como poros o estomas diafragmáticos, están confinados principalmente en la zona muscular del diafragma (Abu-Hijleh et al., 1995). En estas localizaciones las células mesoteliales que cubren la cara peritoneal del diafragma carecen de membrana basal y están conectadas directamente con el endotelio linfático, permitiendo así el drenaje del fluido de la cavidad peritoneal a una laguna linfática subperitoneal. En la laguna linfática, el fluido es conducido hacia los ganglios parasternales y mediastínicos que, finalmente, desembocan en el conducto torácico (Abu-Hijleh et al., 1995; Michailova et al., 1999; Tsilibary and Wissig, 1977; van Baal et al., 2017).

2. EL MESOTELIO PERITONEAL

La cara luminal del peritoneo parietal y visceral está cubierta por un epitelio denominado mesotelio, compuesto por una monocapa de células mesoteliales que están estrechamente unidas entre sí, dando un aspecto de mosaico poligonal (Mutsaers, 2004). El mesotelio descansa sobre el estroma submesotelial, formado por tejido conectivo de densidad variable, compuesto principalmente por fibroblastos embebidos en una matriz de fibronectina, glicosaminoglicanos, colágeno de tipo I y proteoglicanos. Además, en este tejido conectivo se pueden encontrar diferentes tipos celulares como mastocitos o macrófagos, así como vasos sanguíneos y linfáticos (Isaza-Restrepo et al., 2018).

2.1. La célula mesotelial

Las células mesoteliales derivan del mesodermo, y expresan tanto filamentos intermedios característicos de células mesenquimales (vimentina y desmina), como de células epiteliales (citoqueratinas) (Mutsaers, 2004). Las células mesoteliales que conforman el mesotelio peritoneal están íntimamente conectadas entre sí mediante diferentes uniones intercelulares. Estas uniones son:

uniones estrechas, uniones *gap*, uniones intermedias y desmosomas. Las uniones estrechas, desmosomas y las uniones intermedias actúan como soporte estructural del mesotelio, pues anclan eficazmente una célula con su célula adyacente. Por el contrario, las uniones *gap* actúan como canales intercelulares que permiten el intercambio de moléculas pequeñas e hidrofílicas (Isaza-Restrepo et al., 2018). Todas las células mesoteliales tienen microvellosidades y, en menor frecuencia, cilios en su cara apical (Bird, 2004; van Baal et al., 2017). La presencia de microvellosidades en la cara apical de la célula mesotelial supone un incremento en el área efectiva encargada de transportar solutos. La forma, longitud y la densidad de estas prolongaciones celulares varía en función de la localización y puede cambiar en situaciones patológicas (Yung and Chan, 2012). Se han descrito tres tipos de morfologías diferentes de las células mesoteliales: plana, cuboidal y una morfología intermedia entre ambas. La presencia de una u otra morfología responde tanto a diferencias en su localización anatómica, como al estado de activación de la célula mesotelial (Michailova et al., 1999; Mutsaers, 2004). La morfología plana se encuentra en el mesotelio parietal que tapiza la pared peritoneal, y en el mesotelio visceral, que recubre el intestino y el omento, y se caracteriza por una forma más alargada y fina con una cobertura escasa de microvellosidades en su superficie. La morfología cuboidal se localiza principalmente en el mesotelio que cubre diafragma (en la zona donde se confinan los poros diafragmáticos), sobre los "milky spots" del omento y en otros órganos como el bazo e hígado; en este caso las células mesoteliales presentan un núcleo prominente, citoplasma abundante y un denso revestimiento de microvellosidades. Por otro lado, la morfología intermedia se ha descrito únicamente en el mesotelio que cubre el estómago (Michailova et al., 1999).

Distintos mediadores inflamatorios inducen el cambio de la morfología plana a cuboidal, por lo cual esta morfología se ha asociado a un estado activado de la célula mesotelial. En este contexto,

se ha propuesto que las citoquinas inflamatorias producidas por la presencia de células tumorales en la cavidad peritoneal, principalmente IL-8, pero también TNF- α e IL-6, inducen la activación del mesotelio (Yonemura et al., 1997). Durante esta activación, se produce la contracción de las células mesoteliales, que adquieren un aspecto más redondeado, lo que conlleva la alteración de las uniones intercelulares. Estas alteraciones en la barrera mesotelial hacen que la membrana basal quede expuesta, lo cual se ha vinculado con una mayor invasión de las células tumorales -a través del mesotelio- hacia el espacio submesotelial (Iwanicki et al., 2011; Yonemura et al., 1997).

2.2. Funciones del mesotelio

El mesotelio ha sido clásicamente considerado como una membrana lubricada que cubre la pared y los órganos abdominales y facilita el movimiento sin fricción de las vísceras. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las células mesoteliales que lo conforman, no solo actúan como una barrera física que cubre y protege la cavidad peritoneal, sino que también intervienen en el transporte de fluidos y pequeños solutos, así como están involucradas en el mantenimiento de la población de macrófagos peritoneales, además de participar en la defensa frente a procesos infecciosos que tienen lugar en la cavidad peritoneal (Isaza-Restrepo et al., 2018; Iwanicki et al., 2011; van Baal et al., 2017).

En este sentido, se ha propuesto que el peritoneo actúa como una membrana semipermeable que permite el paso de fluido y de pequeños solutos a favor de gradiente osmótico. Para ello, las células mesoteliales peritoneales expresan diferentes moléculas transportadoras de fluido y electrolitos como aquaporinas, canales de calcio y canales de sodio/potasio (Ji and Nie, 2008). Esta capacidad de permitir el paso de fluidos es la base de la diálisis peritoneal, tratamiento que se proporciona como alternativa a la hemodiálisis a los pacientes que sufren insuficiencia renal crónica, los cuales no pueden eliminar las toxinas presentes en la sangre

por vía renal.

Por otro lado, un estudio reciente (Buechler et al., 2019) ha mostrado que las células mesoteliales de diferentes localizaciones del peritoneo intervienen en el mantenimiento de la población macrófagos peritoneales. En este estudio muestran que las células mesoteliales peritoneales (podoplanina⁺ Wt1⁺) secretan ácido retinoico, metabolito necesario para la expresión de Gata6, un factor de transcripción esencial para la identidad y función de los macrófagos peritoneales (Okabe and Medzhitov, 2014).

• Respuesta mesotelial frente a infecciones en la cavidad peritoneal

En la respuesta inflamatoria que se produce en el peritoneo frente a un agente infeccioso participan tanto las células inmunes de la cavidad peritoneal, de las que se hablará con más detalle posteriormente, como las células mesoteliales que recubren el peritoneo visceral y parietal. Las células mesoteliales tienen un papel crítico en la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria gracias a su capacidad de sintetizar mediadores proinflamatorios y quimiotácticos que inducen el reclutamiento de células inflamatorias desde la sangre a la cavidad peritoneal. Las células mesoteliales expresan receptores de reconocimiento de patrones o PRR (del inglés *pattern recognition receptor*) como receptores TLR (del inglés *Toll like receptor*) (Colmont et al., 2011), receptores NLR (del inglés *Nod like receptors*) (Park et al., 2007) y también receptores AGES, de productos finales de glicación avanzada, (Boulanger et al., 2002), que permiten reconocer moléculas endógenas como las proteínas de la familia S100 o la proteína nuclear HMGB1. La activación de las células mesoteliales tras reconocer ligandos bacterianos y fúngicos, así como tras detectar la presencia de células necróticas, desencadena la producción de mediadores inflamatorios como TNF- α , CCL2, IL-6, CXCL8 y CXCL1, siendo estos últimos potentes inductores del reclutamiento de neutrófilos (Colmont et al., 2011; Eigenbrod et al., 2008; Yao et al., 2004).

En conclusión, el mesotelio, además de actuar

como una barrera física, contribuye al mantenimiento de la población de macrófagos peritoneales, y participa activamente en los procesos infecciosos que tienen lugar en la cavidad peritoneal. Sin embargo, esta barrera protectora proporciona a las células tumorales que han invadido el espacio submesotelial, un nicho privilegiado en el que poder implantarse, favoreciendo así la progresión y metástasis tumoral (Mikuła-Pietrasik et al., 2018).

• Interacción entre las células mesoteliales las células neoplásicas durante la metástasis peritoneal

El mesotelio peritoneal es la localización en la cavidad peritoneal en la que se desarrollan preferencialmente las metástasis de tumores ováricos, colorrectales y gástricos (Coccolini et al., 2013). El mesotelio peritoneal también puede verse alterado por la transformación tumoral de las propias células mesoteliales (mesotelioma), siendo la presencia de mesoteliomas malignos en la cavidad peritoneal poco frecuente. El desarrollo de tumores en el peritoneo se produce principalmente por el desprendimiento de células de tumores primarios que, una vez en la cavidad peritoneal, se anclan al mesotelio peritoneal. El inicio de esta metástasis peritoneal requiere la interacción entre la célula tumoral y el mesotelio visceral o parietal. Se ha propuesto en un modelo de tumor ovárico (Iwanicki et al., 2011) que la unión entre célula mesotelial y célula tumoral está mediada por la interacción entre las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ expresadas por las células de tumor ovárico y las moléculas de fibronectina presentes en la superficie de la célula mesotelial. En un modelo de tumor colorrectal, se ha demostrado que dicha interacción mesotelio-célula tumoral desencadena la apoptosis de las células mesoteliales a través del sistema Fas/fas ligando (Heath et al., 2004). La muerte de las células mesoteliales provocaría la ausencia de barrera mesotelial en estas localizaciones, favoreciendo con ello la invasión del espacio submesotelial.

Además de inducir la muerte de las células

mesoteliales, las células tumorales han desarrollado una serie de mecanismos que les permiten invadir e implantarse en el estroma submesotelial. Entre ellos, se ha descrito que la presencia de las células tumorales en la cavidad peritoneal desencadena la formación de discontinuidades en la barrera mesotelial (Yonemura et al., 1997), que facilitan la migración de las células tumorales, a través del mesotelio, hacia el espacio submesotelial. Las células tumorales modifican y vascularizan el estroma, lo cual favorece la proliferación del tumor y, con ello, la progresión de la metástasis peritoneal (Mikuła-Pietrasik et al., 2018).

3. CÉLULAS INMUNES DE LA CAVIDAD PERITONEAL

La información recogida en la literatura sobre el sistema inmune de la cavidad peritoneal se ha basado clásicamente en el análisis de las células inmunes recuperables al realizar un lavado peritoneal, tanto en condiciones de reposo como en distintas condiciones experimentales. Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el omento y los FALCs (*fat associated lymphoid clusters*) tienen un papel determinante en relación con los mecanismos de defensa de la cavidad peritoneal.

En condiciones de reposo, las principales poblaciones de células inmunes que se han identificado en el lavado peritoneal son células B1, macrófagos y, en menor frecuencia, células T, células B2, células NK, células dendríticas, eosinófilos y mastocitos (Bain et al., 2016; Ghosn et al., 2010).

3.1. Células B1

Las células B1 constituyen una de las poblaciones mayoritarias en las cavidades serosas (peritoneal, pleural y pericárdica) pero, sin embargo, son poco abundantes en ganglios linfáticos, bazo y médula ósea (Baumgarth, 2011). A diferencia de las células B2, las células B1 son células B residentes de tejido, que tienen un origen embrionario puesto que derivan de precursores hematopoyéticos fetales. Las células B1 colonizan las cavidades serosas

durante el desarrollo embrionario y se mantienen mediante autoproliferación durante la vida adulta, con una contribución muy reducida de precursores de médula ósea (Ansel et al., 2002; Baumgarth, 2011). Son particularmente frecuentes en la cavidad peritoneal, donde expresan niveles altos de IgM, CD11b y CD43, y niveles reducidos de B220, CD23 e IgD, a diferencia de la población de células B2, que presenta un fenotipo IgM^{low} CD11b^{low} B220^{high} CD23^{high} IgD^{high} (Hastings et al., 2006). Las células B1 son la principal fuente de anticuerpos naturales, anticuerpos de baja afinidad que reconocen epítomos comunes de diferentes patógenos y que favorecen su neutralización directa o mediada por el sistema del complemento (Panda and Ding, 2015). Además de la producción de IgM, las células B1 peritoneales son capaces de migrar a la lámina propia del intestino donde contribuyen a la producción de IgA (Kroese et al., 1989; Okabe and Medzhitov, 2014). Dicha producción de IgA en la luz intestinal previene la adhesión, y subsiguiente invasión de la barrera epitelial por los microorganismos. Por tanto, las células B1 peritoneales no sólo participan en la inmunidad peritoneal, sino que también intervienen en la regulación de la homeostasis intestinal, proporcionando anticuerpos específicos contra los componentes de la flora comensal.

3.2. Macrófagos peritoneales

Diversos trabajos han descrito el papel esencial que desempeñan los macrófagos residentes de diferentes localizaciones, como los macrófagos alveolares en el pulmón y las células de Kupffer en el hígado, en el mantenimiento de la homeostasis y en la inmunidad frente a procesos infecciosos (Davies et al., 2013a).

En la cavidad peritoneal se ha descrito la coexistencia de dos poblaciones de macrófagos que difieren en su fenotipo, origen y función: los LPMs (del inglés *large peritoneal macrophages*) y los SPMs (del inglés *small peritoneal macrophages*) (Ghosn et al., 2010). Ambas poblaciones de macrófagos han sido identificadas en diversas cepas de ratón, como

C57BL/6, BALB/c, 129/S6, FVB/N y Rag1^{-/-} (Ghosn et al., 2010). Inicialmente, estas poblaciones fueron clasificadas en base a su morfología y a su expresión diferencial de la glicoproteína F4/80, marcador de macrófagos residentes; y de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de tipo 2 o MHC-II. De este modo, la población de LPMs, la población mayoritaria en condiciones de reposo (90%), expresa niveles altos de F4/80 y niveles reducidos de MHC-II. Por el contrario, la población de SPMs, que constituye el 10% de los macrófagos peritoneales, se caracteriza por una elevada expresión de MHC-II y una baja expresión de F4/80. Recientemente se ha descrito la existencia de otros marcadores como Gata6, ICAM-2 o CCR-2 que se expresan diferencialmente entre LPMs y SPMs, los cuales han sido recogidos en la [Tabla 1](#) (Ghosn et al., 2010; Liao et al., 2016; Nguyen et al., 2017; Okabe and Medzhitov, 2014).

• **SPMs (small peritoneal macrophages)**

A diferencia de los LPMs, los SPMs son reemplazados de manera continua por monocitos de médula ósea de manera CCR2 dependiente (Kim et al., 2016; Okabe and Medzhitov, 2014). Por otra parte, los SPMs son células que presentan una vida media corta, tal y como se demuestra en el estudio desarrollado por Bain y colaboradores, donde utilizaron un modelo de ratón en el que la expresión de la histona 2b fusionada con la proteína verde fluorescente (H2B)-GFP, se inducía tras la administración de doxiciclina (Bain et al., 2016). Tras el tratamiento con doxiciclina, la población de SPMs se marcaba fluorescentemente, pero el marcaje desaparecía rápidamente a los pocos días, confirmando el hecho de que los SPMs son células que presentan una vida media corta (Bain et al., 2016).

Por otro lado, pocos estudios han abordado las funciones desarrolladas por los SPMs tanto en condiciones homeostáticas como durante procesos patológicos. En primer lugar, se ha propuesto que los SPMs podrían intervenir en la eliminación

de patógenos en la cavidad peritoneal ya que son capaces de fagocitar bacteria *in vivo* (Ghosn et al., 2010). Del mismo modo, se ha sugerido que los SPMs responden activamente durante un proceso inflamatorio en la cavidad peritoneal, puesto que producen óxido nítrico en respuesta a estimulación con lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Ghosn et al., 2010). Por otro lado, estudios recientes sugieren que la expresión de marcadores como MHC-II, CD80 y CD86 reflejaría la participación de los SPMs en la presentación de antígenos a células T (Liao et al., 2016).

• **LPMs (large peritoneal macrophages)**

La población de LPMs es la población mayoritaria de macrófagos peritoneales en condiciones de reposo (alrededor de un 90% del total de macrófagos peritoneales). Presentan una morfología característica de macrófagos residentes de otras localizaciones anatómicas: núcleo ovalado, abundante citoplasma con numerosas vacuolas y un tamaño de 10-15 µm de diámetro (Nguyen et al., 2017).

Además de la expresión de F4/80 que se ha mencionado anteriormente, los LPMs se caracterizan por la expresión de la integrina CD11b, la proteína de adhesión celular ICAM-2, la tirosina quinasa Mer (MERTK), el receptor de fosfatidil serina Tim4, así como del factor de transcripción Gata6 [Tabla 1](#); (Nishi et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014). Estudios recientes han identificado otros marcadores fenotípicos que se expresan en los LPMs, como son CD9, CD24 y CD93 (Rosas et al., 2014)

Origen

A lo largo de la última década se han realizado numerosos estudios destinados a analizar el origen de los LPMs en condiciones de reposo. Por una parte, se ha propuesto que los LPMs derivan casi exclusivamente de precursores embrionarios (macrófagos primitivos del saco vitelino y monocitos del hígado fetal). Estos progenitores colonizarían la cavidad peritoneal durante el desarrollo fetal y los macrófagos a los

que dan lugar se mantendrían a sí mismos mediante autoproliferación, sin apenas contribución de precursores de médula ósea (Hashimoto et al., 2013). Sin embargo, trabajos más recientes utilizando diferentes modelos de *fate mapping* han demostrado que los monocitos derivados de hematopoyesis adulta reemplazan parcialmente a esta población de macrófagos embrionarios de manera progresiva, adquiriendo un fenotipo y función equivalente. Por tanto, en el estadio adulto, la población de LPMs que observamos en el peritoneo estaría formada por células de origen embrionario y células derivadas de hematopoyesis adulta (Bain et al., 2016; Hoeffel et al., 2015; Sheng et al., 2015).

Cabe mencionar que la tasa de reemplazo de los LPMs embrionarios por parte de precursores de médula ósea varía en función del género del ratón, siendo mayor en el caso de los machos que en el caso de las hembras (Bain et al., 2016). Se ha propuesto que la mayor concentración de adipocinas presentes en los machos, dado su mayor desarrollo de grasa gonadal, podría explicar las diferencias determinadas por el género observadas (Bain et al., 2016).

Los LPMs tienen una vida media larga, tal y como se ha descrito en el trabajo desarrollado por (Bain et al., 2016). En este estudio se utilizó un modelo de ratón (H2B-GFP) en el que el tratamiento con doxiciclina inducía el marcaje fluorescente de la población de LPMs, marcaje que se preservaba hasta 14 semanas, demostrando así la larga vida media de esta población de macrófagos y su baja tasa de proliferación en condiciones de reposo. Por otro lado, diversos trabajos han propuesto que el omento podría participar en el mantenimiento de la población de LPMs, albergando precursores de macrófagos que, mediante proliferación local, darían lugar a nuevos LPMs, los cuales tras expresar el factor de transcripción Gata6, migrarían a la cavidad peritoneal (Daems and De Bakker, 1982; Okabe and Medzhitov, 2014; Wijffels et al., 1992).

Gata6 es un factor de transcripción que tiene un papel determinante en la diferenciación de los

LPMs (Gautier et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014; Rosas et al., 2014). En este sentido, se ha observado que los ratones deficientes en este factor de transcripción en las células del linaje mieloide (LysM-Gata6^{-/-}), presentan una importante reducción en la población de LPMs, los cuales muestran alteraciones en supervivencia (con una mayor tasa de apoptosis), proliferación (mayor tasa de proliferación basal y poliploidia) y metabolismo (más orientado a fosforilación oxidativa) (Gautier et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014; Rosas et al., 2014). También se ha propuesto que la ausencia de Gata6 en los LPMs induce la adquisición de un fenotipo alternativo (Gautier et al., 2014) con una mayor expresión de marcadores como LYVE-1, Arg1, y de CD206. Por último, la falta de este factor de transcripción en los LPMs altera su funcionalidad, pues inhibe parcialmente la capacidad de estos macrófagos de polarizar a las células B1 peritoneales, fenómeno que será detallado posteriormente.

Función de los LPMs durante condiciones homeostáticas

Diversos trabajos realizados a lo largo de la última década han puesto de manifiesto que los LPMs desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento de la homeostasis de la cavidad peritoneal.

En primer lugar, los LPMs tienen un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células apoptóticas en la cavidad peritoneal, función que está determinada por la expresión de receptores como CD36, MERTK, y Tim4. Tim4 es un receptor de fosfatidil serina que se expresa en la membrana plasmática de los LPMs e interviene en procesos de adhesión y captación de células apoptóticas (Nishi et al., 2014). La interacción de Tim4 con los residuos de fosfatidil serina expuestos en las células apoptóticas contribuye a una eficaz internalización de las células muertas (Wong et al., 2010). La eliminación de células apoptóticas es importante en condiciones de reposo, pero es esencial durante un proceso inflamatorio. En este sentido, se ha descrito en ratones deficientes en

Tim4, que la ausencia de este receptor se asocia con una mayor presencia de restos de células apoptóticas en la cavidad peritoneal (Wong et al., 2010), así como con la producción de autoanticuerpos (Miyanishi et al., 2007).

En segundo lugar, tal y como se ha citado anteriormente, los LPMs intervienen en el reclutamiento, mantenimiento y diferenciación funcional de las células B1 peritoneales. Por un lado, los LPMs expresan altos niveles de CXCL13, quimioquina que participa en la migración de las células B1 a la cavidad peritoneal (Ansel et al., 2002). Por otro lado, los LPMs intervienen en la diferenciación funcional de las células B1 mediante a la producción de TGF- β 2. Este factor es esencial, junto con el ácido retinoico, para el cambio de clase de IgM a IgA, así como para la expresión de diferentes receptores de *homing* como CCR9 y α 4 β 1, necesarios para la migración de las células B1 desde el peritoneo a la lámina propia (Okabe and Medzhitov, 2014; Roy et al., 2013). Por tanto, los LPMs además de participar en el reclutamiento de las células B1 a la cavidad peritoneal y la migración de éstas a la lámina propia, intervienen en la inmunidad intestinal, puesto que son necesarios para la producción de IgA por las células B1 peritoneales (Okabe and Medzhitov, 2014).

4. OMENTO

El omento es un órgano que se encuentra en la cavidad peritoneal y se forma a partir del mesenterio del estómago (*dorsal mesogastrium*). En el ratón, el omento aparece como una fina banda de grasa que se extiende a lo largo de la curvatura mayor del estómago y está conectado mediante ligamentos membranosos al colon, bazo, estómago y páncreas. Sin embargo, en los humanos la envergadura del omento es mucho mayor -entre 300 y 1500 cm²- y cubre la mayor parte de los órganos abdominales (Platell et al., 2000; Wilkosz et al., 2005).

Estudios publicados a lo largo de los últimos años han puesto de manifiesto el papel del omento en el mantenimiento de poblaciones peritoneales (como macrófagos y células B1), así como por su

participación en los mecanismos de defensa de la cavidad peritoneal (Meza-Perez and Randall, 2017). Por otra parte es interesante mencionar que, durante décadas, el omento fue utilizado en pacientes sometidos a diferentes intervenciones quirúrgicas a consecuencia de patologías como infarto de miocardio, inflamación pulmonar, transección medular y patologías abdominales. En dichas intervenciones, los cirujanos colocaban el omento en la zona dañada, lo que favorecía la regeneración tisular -gracias a su capacidad angiogénica- y, con ello, una mejor recuperación post-quirúrgica (Goldsmith, 1994; Shah et al., 2012).

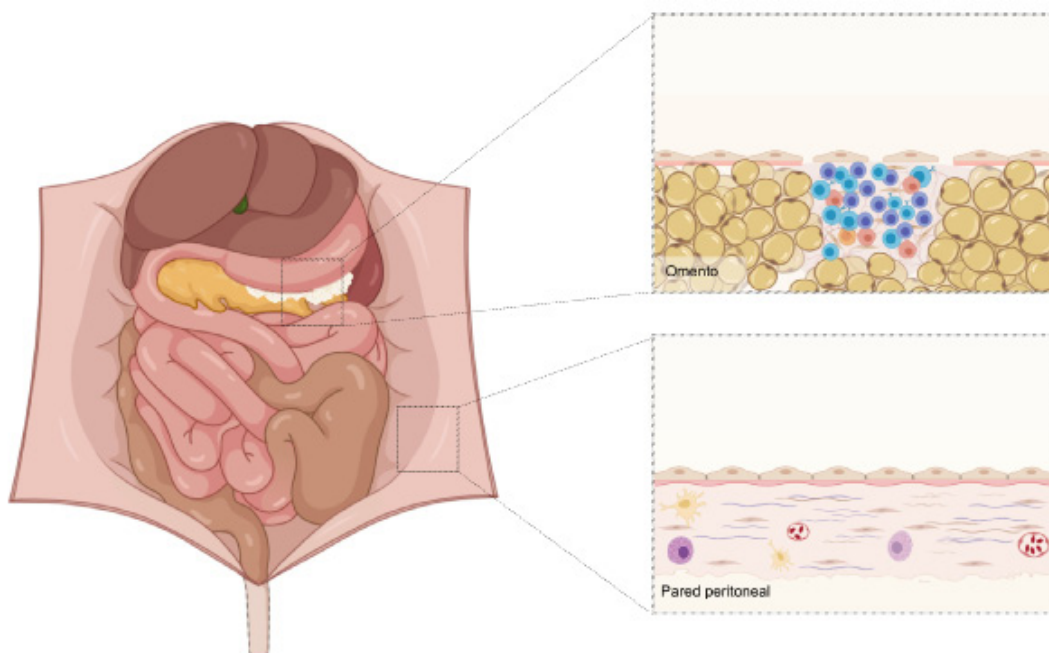
4.1. Estructura

El omento está formado principalmente por tejido adiposo, compuesto por adipocitos asociados a tejido conectivo en el que se organizan unas estructuras llamadas "*milky spots*" (MS). Los *milky spots* son agregados de células inmunes que se localizan debajo de la membrana mesotelial y que están organizados sobre un estroma formado por células fibroblásticas (Perez-Shibayama et al., 2018). Los *milky spots* están compuestos mayoritariamente por células B, células T CD4⁺ y células T CD8⁺, y en menor frecuencia, células NKT (Lynch et al., 2009), células T reguladoras (Vasanthakumar et al., 2015) y macrófagos, que contribuyen al ambiente tolerogénico y antiinflamatorio del omento. Agregados semejantes a los *milky spots* del omento han sido descritos en otras localizaciones formadas por tejido adiposo, como es el caso de la grasa gonadal, mesentérica, pericárdica y mediastínica (Benezech et al., 2015). Estos agregados han sido denominados FALCs, del inglés *fat associated lymphoid clusters*, y contienen poblaciones de células inmunes similares a las descritas en el omento (Wilkosz et al., 2005). El omento es un órgano muy vascularizado, que en el caso del ratón cuenta con un vaso arterial y un vaso venoso central. La arteria central se ramifica en multitud de capilares que, en las zonas de *milky spots*, forman una red vascular particularmente desarrollada, formando unas estructuras denominadas glomérulos omentales

(Gerber et al., 2006). En los *milky spots*, algunos vasos expresan marcadores como PNAd y MAdCAM-1, marcadores que también se expresan en las vénulas del endotelio alto, estructuras vasculares que, en los órganos linfoides, están involucradas en la extravasación de células inmunes (Buscher et al., 2016). En este sentido, se ha descrito que la integrina $\alpha_4\beta_7$, ligando de MAdCAM-1, interviene en la trans migración de células B desde los vasos sanguíneos al omento (Berberich et al., 2014). De este modo, se ha propuesto que los *milky spots* del omento son zonas de tránsito de células desde el torrente sanguíneo a la cavidad peritoneal (Berberich et al., 2014). Con respecto a la circulación linfática del omento, aunque el omento no recibe vasos linfáticos aferentes, alrededor de los *milky spots* se originan vasos linfáticos eferentes que drenan la linfa a los ganglios mediastínicos (Gerber et al., 2006).

gastrointestinales y ováricos, que tienden a colonizar preferencialmente el omento. Este tropismo se produce en parte por la existencia de un mesotelio discontinuo que cubre los *milky spots*, lo que facilita que estas estructuras inmunes resulten particularmente accesibles para las células tumorales (Meza-Perez and Randall, 2017). También se ha propuesto que tanto la estructura vascular del omento, que proporciona un microambiente hipóxico, como las poblaciones celulares antiinflamatorias presentes en el omento -que no favorecen el desarrollo de una respuesta inmune contra las células tumorales-, contribuyen a la progresión de la metástasis peritoneal (Meza-Perez and Randall, 2017). Por lo tanto, se ha considerado que el omento actúa como nicho pre-metastático, que no favorece el desarrollo de respuesta antitumoral efectiva, promoviendo de este modo el crecimiento del tumor (Chkourko et al., 2016).

El omento es el órgano diana de la metástasis de diferentes tumores peritoneales, como tumores



Estructura de la pared peritoneal y de los *milky spots* del omento: Representación esquemática de la organización de los *milky spots* del omento (imagen superior) y de la pared peritoneal (imagen inferior) en condiciones de reposo. Los *milky spots* del omento están constituidos por agregados de células inmunes, principalmente linfocitos, y en menor medida macrófagos, embebidos en tejido adiposo, y organizados gracias a un estroma reticular. Estas estructuras, que están muy vascularizadas, están recubiertas por un mesotelio discontinuo que favorece el tránsito de células entre el omento y la cavidad peritoneal. A diferencia de las zonas de *milky spots* del omento, la pared peritoneal está tapizada por un mesotelio continuo, donde las células mesoteliales, que presentan una morfología plana y alargada y están estrechamente unidas entre sí, descansan sobre el estroma submesotelial, formado principalmente por tejido conectivo. Ilustración creada mediante la plataforma www.Biorender.com

4.2. Función

En primer lugar, el omento esta involucrado en la diferenciación funcional de los LPMs, tal y como demuestra el trabajo realizado por Okabe y colaboradores, donde describen que el ácido retinoico producido en el omento es esencial para la expresión del factor de transcripción Gata6 en los LPMs, lo que determina su identidad y función (Okabe and Medzhitov, 2014). Cabe mencionar que en este estudio no abordan cuales son las poblaciones celulares del omento responsables de la producción de ácido retinoico, lo que ha sido recientemente descrito en el trabajo desarrollado por (Buechler et al., 2019) en el que demuestran que la fuente del ácido retinoico en el omento son las células mesoteliales y fibroblásticas. En relación con estos datos, diversos trabajos han propuesto que el omento contiene progenitores de LPMs (Daems and De Bakker, 1982; Okabe and Medzhitov, 2014) que mantendrían su proliferación gracias a la producción de M-CSF por parte de las células estromales del omento (Ratajczak et al., 1987), y darían lugar a nuevos macrófagos que, tras expresar Gata6, migrarían a la cavidad peritoneal (Okabe and Medzhitov, 2014). En segundo lugar, el omento interviene en el mantenimiento de la población de células B1 peritoneales (Ansel et al., 2002). Se ha descrito que la población de células B1 se mantiene en el omento y en la cavidad peritoneal gracias a la producción de CXCL13 por las células estromales del omento y por los macrófagos de la cavidad peritoneal. En este sentido, se ha propuesto que las células B1 utilizan los *milky spots* del omento como vía principal de entrada a la cavidad peritoneal (Ansel et al., 2002). Finalmente se ha propuesto que el omento participa en la defensa frente a infecciones peritoneales, tal y como se detallará posteriormente.

5. RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE DE LA CAVIDAD PERITONEAL FRENTE A INFECCIONES

Distintos estudios realizados a lo largo de los últimos años han mostrado que la administración intraperitoneal de agentes irritantes como

zymosan, tioglicolato o LPS, genera una respuesta inflamatoria en la cavidad peritoneal que induce tanto el reclutamiento de células inflamatorias así como también altera la dinámica de las poblaciones de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal (Davies et al., 2013b; Gautier et al., 2013; Okabe and Medzhitov, 2014)

En primer lugar, durante un proceso inflamatorio en la cavidad peritoneal, como el producido tras la inoculación de zymosan, TNF- α o *E. coli* inactivada por calor (Buscher et al., 2016; Davies et al., 2013b), se produce un reclutamiento de neutrófilos al peritoneo. El estudio llevado a cabo por Buscher y colaboradores ha demostrado que el omento actúa como vía de entrada de estas células inflamatorias desde el torrente sanguíneo a la cavidad peritoneal, donde los neutrófilos presentes en la vasculatura de los *milky spots* del omento se extravasan a través de las vénulas del endotelio alto, proceso dependiente de PNA^d, CD11b, E- y L- selectina (Buscher et al., 2016). Una vez en los *milky spots* del omento, los neutrófilos migran a la cavidad peritoneal atravesando la membrana basal discontinua y el mesotelio fenestrado que se encuentra en estas localizaciones.

Del mismo modo, la producción de diferentes quimioquinas y citoquinas durante un evento inflamatorio en el peritoneo induce el reclutamiento de monocitos Ly6c^{high} tanto al omento como a la cavidad peritoneal. En este sentido, un estudio reciente ha ilustrado que en la fase inicial de un proceso infeccioso los monocitos son rápidamente reclutados a los *milky spots* del omento, atraídos por mediadores inflamatorios como TNF- α y CCL2, producidos por las células reticulares del omento (Perez-Shibayama et al., 2018). El reclutamiento de neutrófilos y monocitos al omento durante un proceso inflamatorio en la cavidad peritoneal produce un incremento, tanto en número como en tamaño, de los *milky spots*, que refleja el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el omento (Benezech et al., 2015; Buscher et al., 2016). Aunque es posible que los monocitos que inicialmente se

reclutan al omento migren posteriormente a la cavidad peritoneal, no hay estudios concluyentes que indiquen que los monocitos que son reclutados al omento sean aquellos presentes en la cavidad peritoneal, lo que si se ha demostrado en el caso de los neutrófilos. Los monocitos Ly6c^{high} detectados en la cavidad peritoneal se diferencian a macrófagos inflamatorios (MHC-II^{high} F4/80^{low} Cd11b^{high}), tal y como ha descrito Gautier y colaboradores utilizando un modelo de inflamación peritoneal estéril, en el que demostró que la población de macrófagos inflamatorios estaba ausente en ratones CCR2^{-/-} en los cuales la salida de los monocitos desde médula a la sangre se encuentra bloqueada (Gautier et al., 2013). En la fase de resolución del proceso inflamatorio, aquellas células que han sido reclutadas al peritoneo, principalmente macrófagos y neutrófilos, han de ser eliminadas para evitar la perpetuación de la inflamación. En este sentido, se ha propuesto que, durante la fase de resolución de la inflamación, la mayor parte de los macrófagos inflamatorios MHC-II^{high} F4/80^{low} CD11b^{high} mueren por apoptosis en la cavidad peritoneal, y solo una pequeña proporción migran al ganglio mediastínico, aunque algunos son capaces de persistir en la cavidad peritoneal varias semanas tras la resolución del proceso inflamatorio (Gautier et al., 2013; Newson et al., 2014).

Como se ha citado anteriormente, los LPMs son la población celular más abundante de la cavidad peritoneal en condiciones de reposo. Por ello, además del papel que llevan a cabo en homeostasis, los LPMs son esenciales en la respuesta temprana que tiene lugar durante un proceso inflamatorio en el peritoneo. Diversos estudios sugieren que los LPMs son capaces de responder rápidamente ante un patógeno que invada la cavidad peritoneal. En primer lugar, se ha demostrado que los LPMs son capaces de fagocitar *E. coli* inactivada por calor, proceso que está estrechamente regulado por los mastocitos peritoneales (Dahdah et al., 2014). Estos datos han sido apoyados por varios trabajos, donde por un lado demuestran que los LPMs son capaces de internalizar *E. coli* *in vivo* (Buscher et al., 2016; Ghosn et al., 2010),

y que la eliminación de la población de LPMs, tras administrar liposomas con clodronato, resulta en una mayor carga bacteriana en el peritoneo (Zhang et al., 2019). En segundo lugar, se ha propuesto que los LPMs son capaces de amplificar la respuesta inflamatoria durante los primeros estadios de un proceso inflamatorio en la cavidad peritoneal, mediante la producción de diferentes citoquinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Dioszeghy et al., 2008) y quimioquinas como CXCL1 y CXCL2, que inducen el reclutamiento de neutrófilos al peritoneo (Cailhier et al., 2005; De Filippo et al., 2013). En tercer lugar, estudios recientes sugieren que los LPMs, tras detectar el daño producido al dañar experimentalmente la superficie del hígado, se activan y migran a la zona dañada, donde interaccionan con las células mesoteliales que recubren la superficie hepática, eliminando las células muertas y, favoreciendo con ello, la revascularización de la zona afectada (Wang and Kubes, 2016). Por tanto, los estudios anteriormente citados ponen de manifiesto que los LPMs reaccionan rápidamente ante distintas alteraciones que tienen lugar en el peritoneo, activándose y participando en la inducción de la respuesta inflamatoria. Es interesante mencionar que, durante los primeros estadios de una respuesta inflamatoria peritoneal, se produce un fenómeno denominado MDR (del inglés *macrophage disappearance reaction*), por el que los LPMs no son recuperables transitoriamente al realizar un lavado peritoneal. El grado de desaparición de los LPMs, así como el tiempo requerido hasta que son recuperables tras el inicio de la respuesta inflamatoria, dependen tanto de la dosis y como del agente proinflamatorio utilizado (Davies et al., 2013a). En este sentido, se ha descrito que diferentes estímulos, tanto estériles (zymosan, tioglicolato o LPS) como infecciosos (*Cryptosporidium parvum*), inducen la pérdida transitoria de esta población de macrófagos (Davies et al., 2011, 2013b; Ghosn et al., 2010; Haskill and Becker, 1985; Okabe and Medzhitov, 2014; Rosas et al., 2014). Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce la desaparición de los LPMs no se ha abordado en profundidad. Se ha propuesto que la muerte de los LPMs, su la migración al ganglio

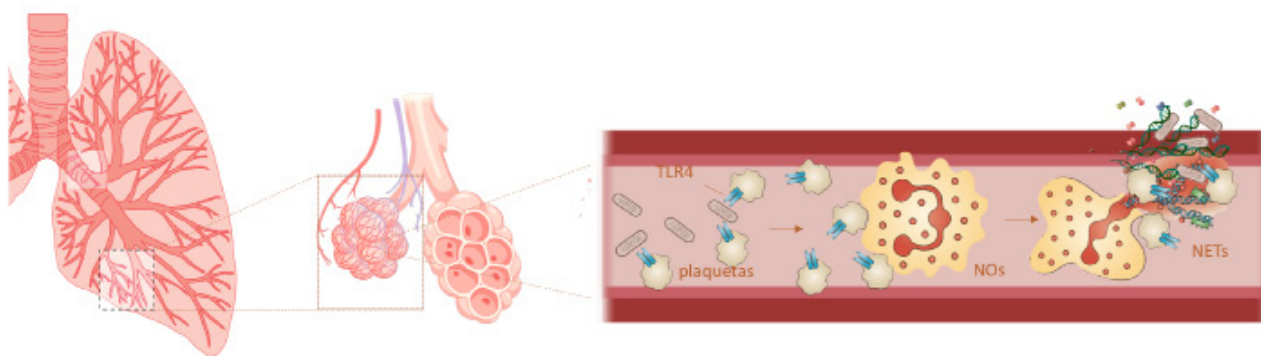
linfático, así como un incremento de su adherencia a la superficie peritoneal podrían explicar el fenómeno de MDR (Barth et al., 1995). Asimismo, otro estudio (Okabe and Medzhitov, 2014) ha sugerido que la inflamación producida tras la inoculación intraperitoneal de LPS induce la migración específica de los LPMs al omento, fenómeno que también podría explicar el MDR. Por lo tanto, a pesar de que el MDR es un proceso que fue descrito a principios de los sesenta, los datos existentes a día de hoy sobre el mecanismo molecular por el que se produce, así como su relevancia fisiológica son controvertidos.

6. SEPSIS

A pesar de la información expuesta anteriormente sobre los avances llevados a cabo en los últimos años, los cuales nos han permitido ahondar en el conocimiento del potencial del sistema inmune de la cavidad peritoneal para responder ante agentes infecciosos, aún existen toda una serie de aspectos que continúan siendo desconocidos acerca de cómo se organiza la respuesta inmune, cuáles son las principales poblaciones celulares encargadas de la defensa frente al patógeno, y cómo se desarrolla la cinética del proceso inflamatorio, que serán el objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. En este sentido, es importante tener en cuenta que las infecciones bacterianas que se producen en la cavidad peritoneal como consecuencia de diferentes agresiones (como el desarrollo de masas tumorales, la formación de úlceras y estrangulación de hernias), si no son controladas localmente por el sistema inmune de la cavidad peritoneal, desencadenan una respuesta hiperinflamatoria sistémica, síndrome clínico que se ha denominado como sepsis. Si ésta no es resuelta, puede provocar una disfunción orgánica aguda, que afecta principalmente al sistema respiratorio y cardiovascular, dando lugar a un cuadro clínico grave denominado sepsis severa (Angus and Van Der Poll, 2013). La sepsis severa puede culminar en shock séptico, que cursa con fallo multiorgánico y que, en un alto porcentaje de los casos, causa la muerte del paciente (Angus and Van Der Poll, 2013).

La sepsis representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad del mundo, afectando a alrededor de 30 millones de personas anualmente (Riedemann, N.C., Ren-Feng G., 2003). En España, la sepsis es uno de los procesos clínicos intrahospitalarios que cuentan una mayor tasa de mortalidad (alrededor del 40%) y coste (estimado en alrededor de 345 millones de euros anuales). Las infecciones intraabdominales o peritoneales son la segunda causa más frecuente de sepsis, por detrás de la sepsis derivada de infecciones en el tracto respiratorio (Angus and Van Der Poll, 2013). En cuanto a los patógenos principalmente detectados en dichas infecciones cabe mencionar que *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* son las bacterias gram-positivas que se observan más comúnmente, mientras que *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* predominan entre las gram-negativas (Angus and Van Der Poll, 2013). Un estudio epidemiológico reciente, en el cual se ha analizado un amplio número de pacientes provenientes de 75 países diferentes, apunta a que las infecciones causadas por patógenos gram-negativos son más frecuentes (62%) que las gram-positivas (47%) y que las causadas por hongos (19%) (Vincent et al., 2009).

En la cavidad peritoneal, los patógenos activan a las células inmunes residentes y a las células mesoteliales a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores reconocen estructuras microbianas conservadas, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Por otro lado, estos receptores también detectan alarminas, moléculas endógenas liberadas por células dañadas a consecuencia de la infección, como son el ADN, ARN, proteínas S100 e histonas (Angus and Van Der Poll, 2013). Este reconocimiento induce una cascada de activación local en las células mesoteliales y células inmunes, que se traduce en la producción de citoquinas con TNF- α , IL1 β , IL-6 y quimioquinas inflamatorias como IL-8, MCP-1, que inducen el reclutamiento de células inflamatorias a la cavidad peritoneal (Stommel et al., 2014). La liberación de estos mediadores perpetua la respuesta inflamatoria inicial y provoca



Formación de NETs en los capilares pulmonares durante un proceso de sepsis. Las plaquetas se acumulan preferencialmente en órganos muy vascularizados como el hígado y el pulmón durante la sepsis. En los sinusoides hepáticos y en los capilares pulmonares, las plaquetas detectan la presencia de bacteria circulante mediante TLR4, proceso que induce su adhesión a los neutrófilos, activando con ello la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). La formación de NETs representa un sistema eficaz que permite capturar la bacteria presente en el plasma pero que, sin embargo, es el responsable del daño colateral observado en el pulmón. Imágenes modificadas de (Mantovani et al., 2011; Altorki et al., 2019) mediante la plataforma www.Biorender.com

un incremento de la permeabilidad vascular. En este sentido, la sepsis severa se asocia con alteraciones en el sistema de la coagulación dado que, durante un proceso de sepsis, la producción de factores procoagulantes como el factor tisular, contrarresta a los mediadores anticoagulantes producidos, como la antitrombina o la proteína C, favoreciendo la formación de coágulos que ocluyen los vasos sanguíneos que irrigan el tejido. Esta hipoperfusión, junto con la vasodilatación e hipotensión que se producen durante la sepsis, causa una reducción en la oxigenación del tejido y, finalmente, daño orgánico agudo (Angus and Van Der Poll, 2013). Las alteraciones en el sistema de coagulación provocan un fenómeno de coagulación intravascular diseminada, proceso que conlleva una importante reducción en el número de plaquetas disponibles en el torrente sanguíneo (trombocitopenia). En este contexto, se ha observado una correlación entre el nivel de trombocitopenia, el grado de severidad de la sepsis y una mayor tasa de mortalidad (Xiang et al., 2013). En el estudio llevado a cabo por Clark y colaboradores demuestran que, en los primeros estadios de la sepsis, la reducción en el recuento plaquetario se produce a consecuencia de la acumulación de las plaquetas, junto con neutrófilos, principalmente en el sistema vascular pulmonar y hepático, donde desempeñan un papel importante en la defensa contra la infección (Clark et al., 2007).

Las plaquetas atrapadas en los capilares hepáticos y pulmonares se activan en presencia de bacterias que se han diseminado desde el foco original, por un proceso dependiente de TLR4 (Clark et al., 2007). La activación de las plaquetas induce su adhesión, dependiente de integrinas β_2 , a los neutrófilos. Este proceso provoca una potente activación de los neutrófilos que liberan su contenido citoplasmático y nuclear formando unas estructuras denominadas trampas extracelulares de neutrófilos o NETs.

Estas estructuras actúan como una barrera física que atrapa y contiene eficazmente a las bacterias circulantes y evita su diseminación sistémica (McDonald et al., 2012). Sin embargo, la formación de las NETs, que contienen proteínas granulares como elastasa, proteasa o lisozima, causan de manera colateral un importante daño en el tejido. Por tanto, la activación de los neutrófilos dependiente de plaquetas en los vasos periféricos es un mecanismo de defensa que, aunque eficaz en la eliminación de la bacteria que se ha diseminado desde la cavidad peritoneal, contribuye sustancialmente al daño hepático que se produce durante un evento de sepsis (Clark et al., 2007).

La potente respuesta hiperinflamatoria que se produce en los primeros estadios de la sepsis desencadena una fuerte respuesta antiinflamatoria,

que permite atenuar de los efectos perjudiciales de la respuesta inflamatoria inicial. Sin embargo, ésta última induce un estado de inmunosupresión e inmunoparálisis que compromete la capacidad del sistema inmune para combatir infecciones subsiguientes. De hecho, en los pacientes que han sobrevivido a un proceso de sepsis, es frecuente la reactivación de infecciones virales que habían permanecido latentes, así como las infecciones causadas por patógenos oportunistas (Angus and Van Der Poll, 2013; Reinhart et al., 2012). Por tanto, la sepsis es una condición médica severa, que presenta altas tasas de incidencia y mortalidad, lo que ha impulsado el estudio detallado de su patofisiología en los últimos años. Para ello se han desarrollado diversos modelos animales entre los que cabe mencionar modelos de sepsis polimicrobiana inducida por CLP (del inglés *cecal ligation and puncture*), modelos de endotoxemia producida por administración sistémica de lipopolisacárido bacteriano (LPS) y modelos de sepsis basados en la administración de inóculos bacterianos (Deitch, 2005; Nemzek et al., 2008). El modelo de LPS es un modelo experimental simple y reproducible, que induce una respuesta inflamatoria aguda. Sin embargo, diversos estudios han mostrado que este modelo no refleja toda la complejidad fisiopatológica y hemodinámica que ocurre en pacientes, puesto que la administración de LPS induce una producción de mediadores inflamatorios rápida e intensa, pero transitoria (Deitch, 2005). El modelo de CLP, utilizado para mimetizar lo que ocurre durante un proceso de sepsis en pacientes, se basa en el ligamiento y perforación del ciego, lo que provoca la salida del contenido cecal a la cavidad peritoneal. En este modelo es difícil estandarizar la cantidad de bacteria que se disemina por la cavidad peritoneal, lo que dificulta la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Por otro lado, este modelo requiere de un proceso quirúrgico para inducir la perforación del ciego, por lo que la inflamación colateral producida por la cirugía dificulta el análisis de la respuesta inmune producida por la infección bacteriana (Dejager et al., 2011). Por su parte, el modelo de administración de inóculos bacterianos

se ha basado en la inoculación intraperitoneal o intravenosa de cultivos poli o monomicrobianos. Entre los modelos polimicrobianos más utilizados, cabe mencionar la transferencia de contenido fecal o FCT (del inglés *fecal content transfer*), basada en la administración intraperitoneal de parte del contenido fecal extraído previamente del ciego de un ratón. Una de las ventajas principales de este modelo es que se inoculan diferentes familias de bacterias, lo que mimetizaría en mayor medida lo que ocurre durante un evento de sepsis en pacientes. Sin embargo, uno de los inconvenientes principales que presenta este modelo es la dificultad en la estandarización del inóculo administrado. Para solventar este problema, se han utilizado modelos en los que la cepa bacteriana inoculada en el peritoneo es conocida. La bacteria que se ha utilizado más ampliamente es *E. coli*, dado que se ha descrito que en pacientes contribuye a la inducción de un cuadro séptico en la cavidad peritoneal (Angus and Van Der Poll, 2013; Deitch, 2005).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La información presentada en la Introducción de esta Tesis Doctoral refleja los avances realizados, a lo largo de los últimos años, particularmente en relación con - la secuencia de eventos que, tras una infección bacteriana de la cavidad peritoneal, provocan una respuesta inflamatoria sistémica que puede conducir a un cuadro clínico de sepsis, - el origen, control de la diferenciación y función de los macrófagos peritoneales residentes, particularmente en relación con la inmunobiología de las células B₁, así como - la caracterización de los mecanismos que causan el tropismo de las metástasis de tumores peritoneales por el mesotelio peritoneal y el omento. Sin embargo, son escasos los estudios que han abordado la respuesta del sistema inmune frente a las infecciones de la cavidad peritoneal, especialmente en lo respecta al control temprano de la infección por las células del sistema inmune innato, la participación de las células inflamatorias reclutadas a la cavidad peritoneal en el curso de la reacción inflamatoria causada por la infección y las consecuencias de la respuesta frente a la infección sobre la integridad del mesotelio peritoneal. En este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral, definidos con el fin de profundizar en el estudio de la función de los macrófagos peritoneales en la defensa frente a la infección intraperitoneal por la cepa M6L₄ de *Escherichia coli*, se detallan a continuación:

- Función de los macrófagos peritoneales residentes (LPMs) en la eliminación de la bacteria y el control temprano de la infección.
- Interacción entre los LPMs y el mesotelio peritoneal durante la infección.
- Correlación entre el fenómeno de MDR y la cinética de los LPMs durante la infección.
- Migración de los LPMs al omento durante la infección.
- Participación de las células inflamatorias reclutadas a la cavidad peritoneal en la defensa frente a la infección.
- Consecuencias de la reacción inflamatoria resultante de la infección sobre la integridad de la pared peritoneal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES BIOLÓGICOS

1.1. Ratones

Los ratones de la cepa C57BL/6 control (CD45.2⁺) fueron suministrados por Charles River (L' Arbresle, Francia). Los ratones de la cepa CCR2^{-/-} en fondo genético C57BL/6 fueron suministrados por el Dr. Frank Tacke, del RW-TH-University Hospital Aachen (Aachen, Alemania). Los ratones LysM-Gata6^{-/-} (*LysM-Cre* and *Gata6-flox/flox*) fueron proporcionados por el Dr. Ruslan Medzhitov (Howard Hughes Medical, Yale University School of Medicine, New Haven, EE. UU.). Los ratones TLR4^{-/-} y Myd88^{-/-} fueron cedidos por el Prof. Manuel Fresno (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España) y por el Dr. Bernhard Ryffel (Centre National de Recherche Scientifique, Université d'Orléans, Francia) respectivamente. Los ratones deficientes NLRP3, IL-1 α / β e IL-1R fueron proporcionados por la Dra. Isabelle Couillin (Centre National de Recherche Scientifique, Université d'Orléans, Francia).

Los animales utilizados, de edades comprendidas entre 8-12 semanas, fueron criados en las instalaciones del Centro Nacional de Biotecnología, en condiciones libres de patógenos. En todo momento se respetaron las recomendaciones nacionales y europeas contempladas en las directivas vigentes sobre la ética y el bienestar de los animales de experimentación. Todos los experimentos llevados a cabo fueron aprobados por el comité de bienestar animal del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo el proyecto PROEX 363-15.

1.2. *Escherichia coli*

La cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) M6L4, aislada del intestino de ratones control, fue cedida por el Dr. Gabriel Nuñez (University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.). La bacteria se hizo crecer en placas de agar con medio Luria-Bertani o LB (BD Biosciences, San Jose, EE.UU.) a 37°C durante 24 horas.

2. REACTIVOS

2.1. Medios de cultivo

Para producir anticuerpos específicos de interés, se cultivaron hibridomas en medio Rosell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Biowest, Nuaille, Francia), suplementado con antibióticos (100 u/L penicilina y estreptomina, Biowest) y aminoácidos (L-Glutamina, Biowest), sodio- piruvato (Biowest) y un 5% de suero bovino fetal (FBS, del inglés *fetal bovine serum*; de Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Alemania).

2.2. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales (mAb) que han sido utilizados en esta Tesis Doctoral se muestran en las [Tablas 2A y 2B](#).

Algunos de ellos fueron purificados a partir del sobrenadante procedente del cultivo de hibridomas, utilizando un equipo Profinia (BioRad, Hercules, California, EE.UU.) con columnas de afinidad (Hi-trapTM protein G HP, Healthcare Bio-sciences AB, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos purificados obtenidos mediante este método fueron conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) o biotina (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, EE.UU.).

Los anticuerpos monoclonales restantes fueron adquiridos en la casa comercial correspondiente, bien purificados o conjugados con biotina, isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), peridina de clorofila (PerCP), ficoeritrina cianina 7 (PE-Cy7), alofocianina cianina 7 (APC-Cy7), Pacific BlueTM (PB) o BrilliantTM Violet-421. Los anticuerpos comerciales utilizados para microscopía confocal, se adquirieron conjugados con cianina 3 ó 5 (Cy3, Cy5) o con los fluoróforos Alexa Fluor[®] (Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 594 y Alexa Fluor[®] 647).

2.3. Sondas fluorescentes

Con el fin de marcar fluorescentemente las poblaciones de células inmunes presentes en la cavidad

peritoneal, se administró intraperitonealmente una única dosis de la sonda fluorescente Cell Trace™ Far Red Cell Stain (15 μ M) (Thermo Fischer Scientific) o de la sonda CFSE (Vybrant™ CFDA-SE Cell Tracer Kit, Invitrogen) (25 μ M), 24 horas antes del inicio de la infección peritoneal. Para las tinciones *in vitro*, se utilizó la sonda fluorescente CFSE a una concentración 4 μ M/ 2×10^6 células procedentes del lavado peritoneal, que se incubaron durante 20 minutos, a 37°C y en condiciones de oscuridad.

3. METODOLOGÍA

3.1. Preparaciones celulares obtenidas mediante lavado peritoneal

Con el objetivo de caracterizar las poblaciones de células inmunes presentes en la cavidad peritoneal se realizó un lavado de la cavidad abdominal. Para ello se administró, vía intraperitoneal, 5ml de tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) que, tras un suave masaje abdominal, fue recogido utilizando una jeringa. Esta solución contenía una muestra homogénea de las células presentes en la cavidad peritoneal. El fluido procedente del lavado peritoneal se centrifugó durante 5 minutos a 1640 rpms. Las células recuperadas se trataron, cuando fue requerido, con tampón de lisis eritrocitaria, para ser posteriormente resuspendidas en PBS suplementado con 3% de FBS y 5mM de EDTA (PBS-EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemania). El recuento celular se llevó a cabo utilizando una cámara Neubauer (Paul Marienfeld GmbH & Co, Lauda-Königshofen, Alemania).

3.2. Suspensiones celulares de omento

El método utilizado para obtener suspensiones celulares de omento se basó en el protocolo llevado a cabo en (Han et al., 2017). En resumen, tras su extracción, el omento fue cortado en pequeños trozos para su posterior digestión con 0.05 mg/mL Liberasa™ TL (Roche, Mannheim, Alemania) y 0.25 mg/mL de DNasa I (Roche) en medio DMEM (del inglés Dulbecco's modified Eagle Medium) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) suplementado con HEPES

1 M y con 1% albúmina sérica baja en ácidos grasos (Sigma-Aldrich). El omento se incubó con esta solución enzimática durante 30 minutos a 37°C con agitación (450 rpms). A continuación, la suspensión resultante fue resuspendida en medio DMEM bajo en glucosa, suplementado con 3% de FBS y DNasa I (1 mg/ml), y filtrada a través de un filtro de 40 micras (Falcon® Corning, Nueva York, EE.UU.). Las células obtenidas, que se recuperaron tras centrifugar esta solución durante 5 minutos a 1640 rpms, fueron contadas utilizando la cámara Neubauer

3.3. Bloqueo del reclutamiento de neutrófilos

Para evaluar si el reclutamiento de neutrófilos afectaba al fenómeno de MDR, se bloqueó la entrada de neutrófilos a la cavidad peritoneal, mediante el uso de un anticuerpo anti-Ly6G-Ly6C denominado anti-GR-1 (clon RB6-8C5). Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con dos dosis de 100 μ g de anti-GR-1, 12 y 2 horas antes de la inoculación de la bacteria.

Por otro lado, con el objetivo de analizar si los neutrófilos contribuían a la eliminación de *E. coli* en el modelo LysM-Gata6^{-/-}, se administró un anticuerpo anti-Ly6G (clon 1A8) a ratones LysM-Gata6^{+/-} y LysM-Gata6^{-/-} en dos dosis de 100 μ g (la primera dosis vía intraperitoneal y la segunda dosis vía intravenosa) 16 y 2 horas antes del inicio del proceso infeccioso.

3.4. Administración de clodronato encapsulado en liposomas

Con el fin de eliminar la población de LPMs, se administró 100 μ l de clodronato encapsulado en liposomas, método ampliamente utilizado para eliminar macrófagos residentes de diversas localizaciones, por vía intraperitoneal 12 días antes del inicio de la infección bacteriana (Liposoma B.V., Amsterdam, Holanda www.clodronateliposomes.com).

4. MODELOS DE INFECCIÓN INTRA-PERITONEAL

4.1. Infección intraperitoneal con *Escherichia coli*

La bacteria *Escherichia coli* de la cepa M6L4 se creció en placas sólidas de medio agar LB, a 37°C durante 24 horas. Tras este periodo, se tomó una colonia aislada, que fue incubada durante aproximadamente 16 horas en medio LB (fase estacionaria). Posteriormente, se diluyó parte del cultivo en fase estacionaria en medio fresco LB, que se incubó durante 2 horas a 37°C y en agitación -150 rpm- (crecimiento exponencial). Esta suspensión bacteriana fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro y, cuando alcanzó la densidad óptica a 600 nanómetros de 0,6 se prepararon diluciones seriadas a partir de dicho cultivo hasta lograr la concentración requerida para su inoculación. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (ip.) con una dosis subletal de 1×10^7 UFC (unidades formadoras de colonias) de *E. coli* en 200 µl de PBS. El estatus de bienestar y sufrimiento de los animales fue monitorizado diariamente siguiendo las guías de Bienestar Animal.

4.2. Transferencia intraperitoneal de contenido fecal.

Para llevar a cabo la técnica de transferencia de contenido fecal o FCT (del inglés *fecal content transfer*), se aisló parte del contenido fecal de la zona del ciego de ratones C57BL/6. El contenido fecal obtenido se pesó, homogenizó y diluyó en PBS (100 mg/ml). Posteriormente, esta solución se centrifugó 5 segundos a 1640 rpm y el sobrenadante obtenido se filtró y diluyó seriadamente (diluciones 1:4 y 1:10). Se tomaron 200 µl de la última dilución que fueron inoculados intraperitonealmente a cada ratón.

5. ENSAYOS EX VIVO

5.1. Análisis de la carga bacteriana

A diferentes tiempos tras la infección i.p. con *E. coli*, se extrajeron asépticamente, previa eutanasia del ratón, el lavado peritoneal, el omento, la pared peritoneal, los ganglios mediastínicos, el pulmón y el hígado. La cara interna de la pared peritoneal fue legrada utilizando raspadores celulares, en 6 ml de PBS. La suspensión celular obtenida fue homogeneizada utilizando el homogeneizador mecánico de tejido Ultra-Turrax T10 basic (Ika, Staufen, Alemania). El omento y los ganglios mediastínicos fueron extraídos asépticamente y homogeneizados en 2 ml de PBS. El hígado y el pulmón fueron extraídos y troceados mecánicamente en fragmentos más pequeños, antes de ser homogeneizados en 6 ml de PBS. El lavado peritoneal se realizó tal y como ha sido detallado en apartados anteriores. Las suspensiones celulares de todos los órganos utilizados se diluyeron seriadamente en PBS en tubos asépticos de 2 ml. De dichas soluciones seriadas se sembraron 25 µl en placas de agar LB, extendiendo el volumen en la mitad de la superficie de la placa. Se hicieron duplicados en cada una de las condiciones. Las colonias se dejaron crecer durante toda la noche a 37 °C con la placa en posición invertida. El cálculo de las UFC en cada órgano se obtuvo relativizando las colonias obtenidas de cada dilución con respecto a las presentes en el órgano completo.

5.2. Transferencia de células de lavado peritoneal marcadas fluorescentemente

2×10^6 células obtenidas del lavado peritoneal de ratones control fueron marcadas *in vitro* con la sonda fluorescente CFSE a una concentración de 4 µM durante 20 min a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se lavó el excedente de la sonda fluorescente, y las células fueron transferidas vía intraperitoneal a ratones C57BL/6, un día antes de la infección intraperitoneal con *E. coli*.

5.3. Cuantificación de la bacteria internalizada en muestras de lavado peritoneal cito-centrifugadas.

1×10^5 células procedentes del lavado peritoneal

de ratones infectados fueron diluidas en PBS suplementado al 20% de FBS y centrifugadas en portaobjetos de cristal, utilizando la citocentrífuga Shandon Cytospin 2 (Thermo Fisher Scientific). La centrifugación se llevó a cabo a 600 rpm durante 10 minutos. Las muestras resultantes fueron teñidas con Giemsa (Sigma-Aldrich) o con azul de toluidina (Merck). El análisis mediante microscopía óptica permitió cuantificar, utilizando el software ImageJ, el número de bacterias internalizadas por macrófagos y neutrófilos de diferentes muestras independientes de lavado peritoneal.

5.4. Extracción LPMs adheridos a la superficie del mesotelio visceral

Con el fin de extraer los LPMs adheridos a la superficie de los órganos peritoneales, el omento, la grasa gonadal, el hígado, el bazo y el paquete intestinal (incluyendo el mesenterio) fueron extraídos de ratones infectados 24 horas antes con *E. coli*. Los órganos completos se incubaron (sin previo procesamiento) en una solución enzimática (0.05 mg/mL Liberasa™ (Roche, Mannheim, Alemania); 0.1 mg/mL de DNasa I (Roche) en medio RPMI) durante 15 minutos a 37°C. El resultado de dicha digestión se pasó a través de un filtro de 40 µm (BD Biosciences, San Diego, EE.UU.) y fue resuspendido en PBS-EDTA al 3% FBS para su posterior recuento en una cámara de Neubauer.

5.5. Aislamiento y posterior análisis de los agregados mediante citometría de flujo

Para caracterizar las poblaciones celulares que constituían los agregados multicelulares formados sobre el mesotelio peritoneal, se realizó un lavado peritoneal en el que se masajeó vigorosamente la pared peritoneal, con el objetivo de desprender los agregados adheridos al mesotelio. El lavado peritoneal resultante fue recogido con una pipeta Pasteur. Los agregados celulares obtenidos en el lavado peritoneal fueron incubados con una solución enzimática (Liberasa, DNasa-I al 1% de FBS en RPMI) durante 15 minutos y a 37 °C. El resultado de

la digestión fue disgregado mecánicamente para su posterior recuento utilizando una cámara de Neubauer

6. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

La bacteria *E. coli* M6L4 fue transformada, mediante el método de electroporación, con el plásmido pGEN22. Este plásmido, suministrado por el Dr. Esteban Veiga (CNB-CSIC), es un plásmido circular no integrativo que contenía tanto el gen que codificaba para la proteína verde fluorescente (GFP), como genes que conferían resistencia a ampicilina. Para la transformación bacteriana, se realizó una dilución en medio fresco a partir de un inóculo de *E. coli* crecido durante la noche. Esta solución se incubó, en fase exponencial, hasta alcanzar una DO₆₀₀ aproximada de 0.5. A continuación, se enfrió el cultivo durante 30 minutos. Posteriormente, las bacterias se sometieron a 3 ciclos de lavado, incubación en agua de miliQ y centrifugación (600 rpm y 4°C), consiguiendo así bacterias electrocompetentes. Esta solución de bacterias electrocompetentes se transfirió, junto con el plásmido a introducir, a cubetas de electroporación. Tras la descarga en el electroporador, las células bacterianas transformadas se seleccionaron en placas de agar LB suplementadas con ampicilina, y se dejaron crecer durante 24h a 37°C.

7. HISTOLOGÍA

Para el análisis histológico de las muestras de omento, los ratones fueron sometidos a una perfusión intracardiaca con una solución de paraformaldehído 4% y glutaraldehído 2,5% en PBS, preparada por el Servicio de Microscopia Electrónica del CNB-CSIC. Tras la perfusión, el omento fue extraído e inmediatamente incubado con la solución fijadora durante 3 horas a temperatura ambiente. Para la visualización de las muestras de pared peritoneal, la membrana peritoneal fue extraída y embebida en la solución fijadora durante 3 horas. Transcurrido ese periodo, tanto las muestras de omento como

de pared peritoneal se incubaron con solución fijadora durante toda la noche a 4°C. Una vez fijadas, las muestras fueron tratadas por el Servicio de Microscopía electrónica del CNB-CSIC, donde se realizaron cortes semifinos de las muestras. Los cortes semifinos fueron teñidos con azul de toluidina para seleccionar, mediante microscopía óptica, las zonas de interés. De aquellas zonas seleccionadas se realizaron secciones ultrafinas para su posterior visualización en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 1011).

8. CITOMETRÍA DE FLUJO

La técnica de citometría de flujo fue utilizada para detectar moléculas expresadas tanto en la superficie de la membrana plasmática de las células hematopoyéticas, como aquellas localizadas en el citoplasma o en el núcleo celular.

8.1. Marcaje en superficie

Para el marcaje en superficie, las células fueron incubadas con mAbs diluidos en PBS-EDTA (5mM) suplementado con FBS al 3%. Se utilizó un volumen de 30 µl por cada 1×10^6 células. En el primer paso, se bloquearon los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR) utilizando anticuerpos purificados anti-FcγII-III (anti-CD16/CD32, clon 24G2) evitando así la posible unión no específica de las inmunoglobulinas a estos receptores. Esta incubación se llevó a cabo durante 15 minutos, a 4°C y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, las células se incubaron con los mAb biotinilados de interés, durante 20 minutos, a 4°C y en oscuridad. Posteriormente las células se incubaron con una última combinación de anticuerpos, tanto aquellos conjugados directamente con diferentes fluorocromos (FITC, PE, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, PerCP, PerCP-Cy5.5, Pacific Blue®, Brilliant Violet-421™), como aquellos conjugados con estreptoavidina (PerCP o APC-Cy7), durante 15 minutos, a 4°C y en condiciones de oscuridad. Las distintas combinaciones de anticuerpos utilizadas se detallan en la [Tabla 2A](#).

Para el análisis de las muestras se empleó

un citómetro LSR II (BD Biosciences) y los datos obtenidos fueron analizados con el software Flow Jo v7.0.7. (TreeStar, Ashland, EE.UU.).

8.2. Marcaje intracelular

Para detectar el nivel de expresión del factor de transcripción Gata6 se realizó, en primer lugar el marcaje de superficie, y a continuación, se llevó a cabo el marcaje intracelular. Para el marcaje intracelular se utilizó el Kit eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent (Invitrogen). Para ello, tras el marcaje extracelular, las células fueron fijadas con 100 µL de buffer Fixation/permeabilization working solution por cada 1×10^6 células. La fijación se llevó a cabo durante 30 min a 4°C y en condiciones de oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 200 µL de tampón de permeabilización y se centrifugaron las células durante 3 minutos a 1640 rpms. Posteriormente las células se incubaron con anti-Gata6, o su correspondiente control de isotipo, durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad.

9. DETERMINACIÓN DE ENZIMAS SÉRICAS INDICATIVAS DE DAÑO TISULAR

Para determinar de los niveles séricos de creatina quinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH), se extrajo el suero de ratones C57BL/6 tanto en condiciones de reposo como en diferentes estadios tras la infección intraperitoneal con *E. coli*. Para la extracción del suero, la sangre obtenida mediante punción cardiaca se depositó en tubos eppendorf de 1,5 mililitros (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Las muestras se dejaron en reposo durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron durante 10 min, a 4°C y a 1500 rcfs. Tras la centrifugación, la fracción superior (de aspecto claro y transparente) correspondiente al suero sanguíneo, fue aspirada cuidadosamente, alícuotada y almacenada a -20 °C hasta su posterior uso. La determinación de la actividad enzimática sérica

se llevo a cabo por el Grupo de la Dra. Guadalupe Sabio (CNIC, Madrid) utilizando un kit comercial (Biosystems) o el sistema *Dimension clinical chemistry* (Siemens).

10. MICROSCOPIA CONFOCAL

10.1. Inmunofluorescencia de tejido completo (whole mount immunofluorescence)

La técnica de *whole mount immunofluorescence staining (WMI)* se basa en la extracción y posterior marcaje fluorescente del órgano completo de interés. Esta técnica, a diferencia del análisis de un órgano en secciones, permite visualizar a nivel global la organización biológica y estructural del órgano en cuestión. Para ello, la pared peritoneal, el omento, la grasa gonadal, el mesenterio y una porción del colon descendente fueron extraídos e inmediatamente fijados en paraformaldehído 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EE.UU) durante 20 minutos a 4°C y, en condiciones de oscuridad. Tras la fijación, las muestras fueron lavadas varias veces en PBS, para eliminar el exceso de fijador, y posteriormente fueron incubadas durante 1 hora en PBS suplementado al 2% con albúmina de suero bovino (BSA, del inglés *bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) para bloquear las uniones no específicas de los anticuerpos.

Para la detección de moléculas expresadas en membrana, las muestras se incubaron toda la noche con los correspondientes anticuerpos primarios (mAb purificados o conjugados con biotina). Estas incubaciones se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos, donde el tejido se embebió en la solución de anticuerpos diluidos PBS-BSA al 2%.

Tras 16 horas de incubación, las muestras de tejido fueron lavadas varias veces con PBS y, posteriormente, se incubaron tanto con anticuerpos directos conjugados con diferentes fluorocromos, como con los anticuerpos secundarios que permitieron detectar la señal de los anticuerpos purificados o biotinilados utilizados en el paso previo. Esta incubación se llevó a cabo durante 2 horas, a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, todas las muestras

fueron marcadas con DAPI (Sigma-Aldrich) diluido en PBS e incubado durante 20 minutos a 4°C y, en oscuridad. Las distintas combinaciones de anticuerpo se han detallado en la [Tabla 2B](#).

Cuando fue requerido, tras la tinción en superficie de las moléculas expresadas en la membrana, las muestras se permeabilizaron con PBS al 0,1 % de Tritón (Tritón X-100, Sigma-Aldrich) durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos correspondientes durante 2 horas a 4°C y en oscuridad.

Para visualizar las muestras, estas se colocaron en placas de 35 mm (IBIDI GmbH, Gräfelfing, Alemania) con medio de montaje Mowiol. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal multiespectral Leica TCS SP8. Las imágenes adquiridas fueron analizadas utilizando el software Image J (NIH, Bethesda, EE.UU).

RESULTADOS

PAPEL DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES EN EL CONTROL TEMPRANO DE LA INFECCIÓN POR *E. COLI*

La infección intraperitoneal con *E. coli* induce un proceso de sepsis

La estrategia experimental utilizada en este estudio se ha basado en el análisis de muestras de lavado, omento y pared peritoneal a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de *E. coli* (Figura 1A), bacteria gram negativa que en pacientes contribuye en gran medida a la inducción de un cuadro séptico en la cavidad peritoneal (Angus and Van Der Poll, 2013). Se ha utilizado la cepa de *E. coli* ML64, aislada del intestino de ratón, que es uno de los componentes de la flora comensal de ratones C57BL/6, por lo que la inoculación de una dosis determinada de esta bacteria por vía intraperitoneal, además de ser un método estandarizado y reproducible, reproducía parcialmente la respuesta que se produce cuando la integridad de la pared intestinal resulta dañada.

Con el objetivo de determinar la dosis de infección subletal, capaz de ser controlada por el sistema inmune, se llevó a cabo un experimento de titulación en el que se valoraron diferentes dosis de *E. coli* tras ser administradas por vía intraperitoneal. El experimento de supervivencia que se muestra en la Figura 1B pone de manifiesto que mientras que el 100% de los ratones infectados con una dosis de 1×10^7 UFCs de *E. coli* sobrevivieron durante al menos 30 días, un 70% y alrededor de un 60% de los ratones infectados con las dosis de 1×10^8 y 5×10^7 respectivamente, sucumbieron a la infección en las primeras horas tras la inoculación bacteriana. Con el fin de comprobar si la dosis de 1×10^7 UFCs de *E. coli* inducía un proceso de sepsis peritoneal se analizaron, 24 horas tras inocular la bacteria, los niveles de diferentes enzimas séricas cuyo incremento en sangre es indicativo de daño hepático, renal o cardíaco. Los resultados obtenidos (Figura 1C) mostraron que la inoculación de esta dosis bacteriana causaba una infección peritoneal que cursaba con un

incremento significativo en los niveles de las enzimas creatina quinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), y lactato deshidrogenasa (LDH).

Una vez establecida la dosis bacteriana, analizamos la evolución de la infección durante las primeras horas postinfección (p.i.). Para ello, se cuantificó la carga bacteriana presente en el lavado peritoneal durante las primeras 4 horas tras inocular la bacteria (Figura 1D). Los resultados obtenidos mostraron que tan sólo 30 minutos p.i., la carga bacteriana se había reducido hasta un 80% de la dosis inicial, puesto que solo se detectaron 2×10^6 UFCs de *E. coli* en el lavado peritoneal. Los análisis llevados a cabo 4 horas más tarde mostraron que esta carga bacteriana continuó reduciéndose, siendo detectable en el lavado peritoneal únicamente un 1% de la dosis inicial (1×10^5 UFCs).

Por tanto, estos datos sugerían que la infección era mayoritariamente controlada en la cavidad peritoneal en los primeros estadios del proceso infeccioso.

Caracterización de las principales poblaciones de células inmunes presentes en la cavidad peritoneal durante los primeros estadios de la infección bacteriana por *E. coli*

A continuación, nos planteamos si el sistema inmune innato era el responsable de la eliminación de la infección bacteriana de la cavidad peritoneal, o bien si la reducción en la carga bacteriana observada respondía a una diseminación sistémica del patógeno que se escapaba del control peritoneal. Para abordar esta hipótesis, analizamos mediante citometría de flujo la dinámica de las principales poblaciones de células inmunes presentes en la cavidad peritoneal. Para ello, en condiciones de reposo, y a diferentes tiempos tras la infección con *E. coli*, se sacrificaron los ratones y las suspensiones celulares procedentes del lavado peritoneal de ratones C57BL/6 fueron analizadas mediante citometría de flujo de 7 colores. En condiciones de reposo, el marcaje con anticuerpos

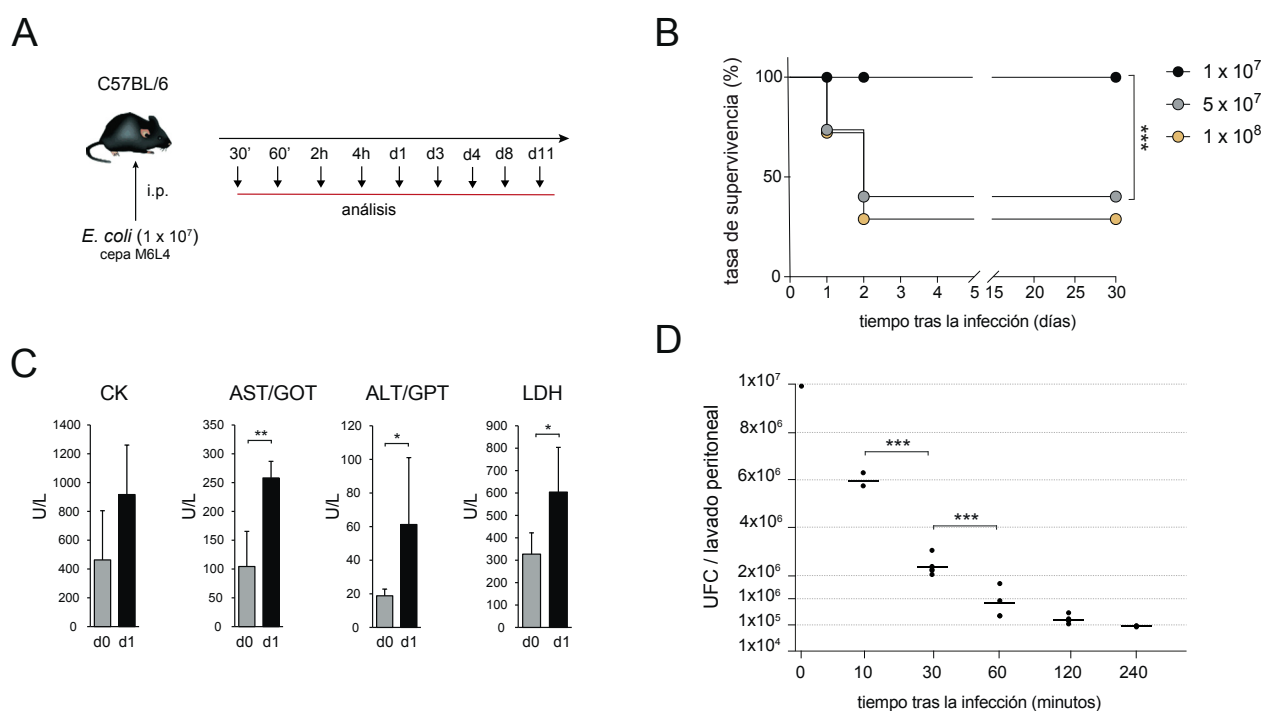


Figura 1. Descripción del modelo de infección intraperitoneal bacteriana.

(A) Protocolo de infección intraperitoneal (i.p.) con *E. coli* M6L4 (1×10^7 UFCs) en ratones C57BL/6 usado en este estudio. (B) Supervivencia de ratones C57BL/6 tras la infección i.p. con 1×10^7 , 5×10^7 ó 1×10^8 UFCs de *E. coli*. Datos representados como una curva de supervivencia Kaplan-Maier. (C) Niveles en sangre periférica de las enzimas creatina quinasa (CK), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y lactato deshidrogenasa (LDH) 24 horas postinfección (p.i.). (D) Carga bacteriana presente en el lavado peritoneal de ratones C57BL/6 en las primeras 4 horas postinfección. Cada punto representa el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) detectadas en el lavado peritoneal de cada animal. Datos representados como media \pm SD de entre 5-8 ratones por condición * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

anti-CD19, anti-CD90.2, anti-Ly6G, anti-CD11b y anti-MHCII, nos permitió distinguir los principales tipos celulares presentes en la cavidad peritoneal: la población de células B (CD19⁺ CD90.2⁻ Ly6G⁻ MHC-II⁺), que constituía una de las poblaciones mayoritarias de células inmunes en la cavidad peritoneal, células T (CD19⁻ CD90.2⁺ Ly6G⁻ MHC-II⁻ CD11b⁻) (Figura 2A) y, dentro de la población CD11b⁺, se distinguieron según su nivel de expresión de los marcadores MHC-II, F4/80, Tim4 y Gata6, las dos poblaciones de macrófagos presentes en la cavidad peritoneal: la población de LPMs y la población de SPMs. Los LPMs son la población mayoritaria de macrófagos peritoneales, constituyendo alrededor de un 40% del total de células hematopoyéticas presentes en el lavado peritoneal que en condiciones de reposo presentaban un fenotipo CD11b⁺ F4/80⁺ MHC-II⁻ Tim4⁺ Gata6⁺ (Figura 2A). La población de SPMs, que representa alrededor del 2% de las células

presentes en el lavado peritoneal, se caracterizaron por su expresión intermedia de CD11b, elevada de MHC-II, y por la falta de expresión de los marcadores F4/80, Tim4 y Gata6 (Figura 2A). Por otro lado, no se detectaron ni neutrófilos (CD19⁻ CD90.2⁻ CD11b⁺ Ly6G⁺) ni monocitos (CD19⁻ CD90.2⁻ CD11b⁺ Ly6G⁻) en el lavado peritoneal en condiciones de reposo.

Tras caracterizar las principales poblaciones de células mieloides y linfoides presentes en el lavado peritoneal en condiciones homeostáticas, pasamos a analizar la evolución de dichas poblaciones durante los primeros estadios del proceso infeccioso, durante los cuales se había observado una importante reducción en la carga bacteriana presente en la cavidad peritoneal (Figura 2B-2C). En primer lugar, durante las primeras 4 horas p.i., se detectó un aumento significativo en el número de monocitos inflamatorios Ly6C^{high} y neutrófilos reclutados a la cavidad peritoneal (Figura 2B-2C).

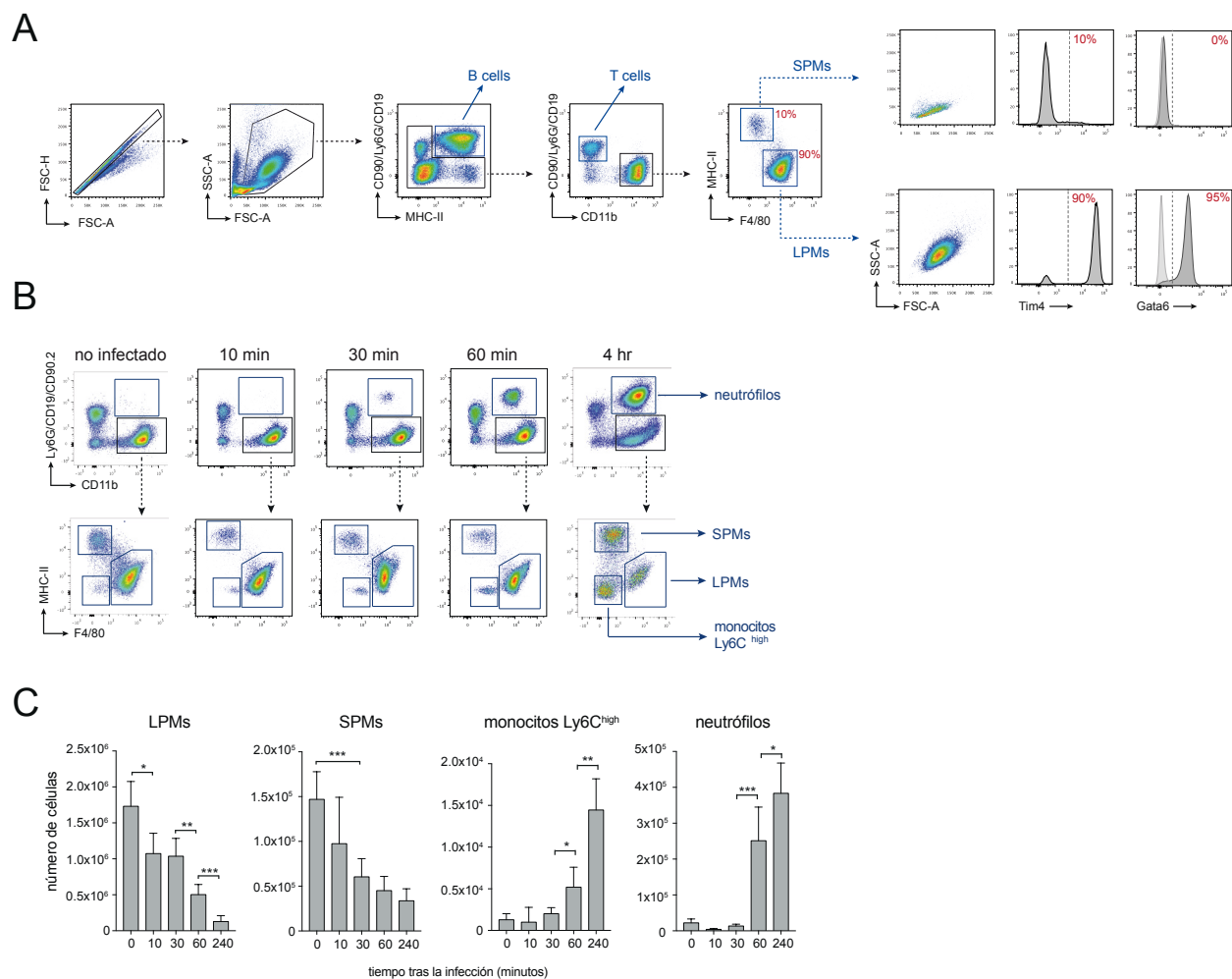


Figura 2. Cinética de las principales poblaciones mieloides presentes en el lavado peritoneal en condiciones de reposo y durante la infección i.p. con *E. coli*.

(A) Estrategia de definición de las principales poblaciones hematopoyéticas presentes en el lavado peritoneal de ratones C57BL/6 en condiciones de reposo mediante citometría de flujo. (B) Análisis mediante citometría de flujo de las poblaciones de LPMs, SPMs, neutrófilos y monocitos presentes en el lavado peritoneal de ratones C57BL/6 a los tiempos indicados tras la infección i.p. con *E. coli*. (C) Número absoluto de las poblaciones indicadas en (B), presentes en el lavado peritoneal tras la infección bacteriana. Datos representados como media \pm SD de 5-6 ratones por condición. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 5 experimentos independientes.

En segundo lugar, observamos que paralelamente al reclutamiento de células inflamatorias, las poblaciones de macrófagos peritoneales también se vieron afectadas durante las primeras fases del proceso infeccioso. En este sentido, tanto la población de LPMs como de SPMs, sufrieron una paulatina, pero significativa, reducción en número durante las primeras 4 horas p.i. La población de LPMs se redujo hasta un 80% mientras que la población de SPMs disminuyó en un 60% (Figura 2B-2C). Como se ha expuesto en el apartado de Introducción de este trabajo, esta importante reducción en la población de LPMs a consecuencia

de un proceso inflamatorio, fue originalmente descrita a principio de los años 60 como "reacción de desaparición de los macrófagos" o MDR (*macrophage disappearance reaction*), fenómeno por el cual, tras una reacción inflamatoria en la cavidad peritoneal, los macrófagos peritoneales no eran recuperables transitoriamente al realizar un lavado peritoneal (Barth et al., 1995).

El control temprano de la infección bacteriana en la cavidad peritoneal está regulado por la población de LPMs

Nuestros datos han puesto de manifiesto que, durante las primeras fases del proceso infeccioso, se produce una importante reducción en la carga bacteriana detectada en el lavado peritoneal, proceso que transcurre paralelamente al reclutamiento de neutrófilos y monocitos inflamatorios a la cavidad peritoneal y a la reducción en las poblaciones de LPMs y SPMs.

Uno de los principales y más rápidos mecanismos que posee el sistema inmune innato para controlar una infección bacteriana, es la internalización y posterior eliminación del patógeno invasor (Gordon, 2016). Para ello, las células del sistema fagocítico (principalmente monocitos/macrófagos y neutrófilos) están equipadas con una potente capacidad microbicida lo que hace que desempeñen un papel crucial en la defensa frente a múltiples infecciones (Prame et al., 2018). En este sentido, con el fin de explorar la capacidad de internalización de *E. coli* por parte de las células inmunes presentes en la cavidad peritoneal, la cepa M6L4 de *E. coli* fue transformada con un plásmido que contenía el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), de tal manera que las bacterias resultantes de la transformación emitirían fluorescencia. Por tanto, esta herramienta nos permitió identificar las poblaciones celulares involucradas en la internalización de la bacteria puesto que, aquellas que capturaran al patógeno, emitirían la señal GFP procedente de la bacteria. Así, infectamos ratones con *E.coli*-GFP por vía intraperitoneal, que fueron sacrificados a los 30 y 60 minutos postinfección. Las suspensiones celulares obtenidas tras realizar el lavado peritoneal se analizaron mediante citometría de flujo. Tras los primeros 30 minutos p.i., se observó que alrededor de un 80% de los LPMs y un 70% de los SPMs eran GFP⁺, lo que indicaba que alrededor de 8×10^5 LPMs y $0,35 \times 10^5$ SPMs habían internalizado *E. coli* (Figura 3A-3B). La señal de *E. coli*-GFP no fue detectada en otras poblaciones presentes en la cavidad peritoneal,

como células B o células T.

Cabe mencionar que, a pesar de que los neutrófilos podrían contribuir a la eliminación del patógeno gracias a su elevada capacidad fagocítica, estos apenas eran detectables en el lavado peritoneal a los 30 minutos p.i. (Figura 2C), por lo que no contribuyeron significativamente a la eliminación de la bacteria en esta fase de la infección (Figura 3A-3B). Sin embargo, puesto que estas células son reclutadas activamente a los 60 min p.i., nuestros datos indican que, a partir de este tiempo p.i., los neutrófilos si participan en la eliminación del patógeno (Figura 3A-3B).

Por otro lado, a pesar de que los SPMs y LPMs poseen un potencial de eliminación de *E. coli* similar, es fundamental subrayar la diferencia de tamaño de ambas poblaciones de macrófagos en condiciones de reposo: mientras que la población de LPMs está constituida por alrededor de $1,6 \times 10^6$ macrófagos, el tamaño de la población de SPMs es 10 veces menor (alrededor de $1,5 \times 10^5$). Basándonos en esta información, se puede concluir que la contribución de los LPMs en el control de la infección bacteriana es significativamente mayor a la de los SPMs.

En siguiente lugar, cuantificamos la bacteria internalizada por las células presentes en lavado peritoneal de muestras citocentrifugadas a diferentes tiempos postinfección. El análisis de las muestras obtenidas 30 minutos p.i. mostró que la mayor parte de los LPMs contenían numerosas bacterias en su citoplasma (Figura 3C). La cuantificación del número de bacterias detectadas a los 30 minutos p.i. mostró que cada LPM contenía una media de 7 bacterias en su interior (Figura 3D). A los 60 minutos, solo una minoría de los LPMs contenían bacteria, aunque, en un pequeño porcentaje de ellos, la morfología de la bacteria internalizada (más alargada y con septo bacteriano) indicaba que había producido replicación bacteriana en el interior de los macrófagos (Figura 3C). Esto sugería que, tal y como se ha descrito para otras bacterias como *Salmonella* (Frankenberg et al., 2008), algunas bacterias escaparían del lisosoma

evitando así su degradación. A las 4 horas p.i., fase en la que los LPMs no eran recuperables al realizar el lavado peritoneal (Figura 2C), únicamente se detectó bacteria en los neutrófilos (Figura 3C).

Como se ha mostrado previamente, la cuantificación del número de bacterias internalizadas por los LPMs a los 30 min p.i. mostró que, entre los

LPMs que habían internalizado bacteria, cada uno de ellos contenía una media de 7 bacterias en su citoplasma. Dado que nuestros datos mostraron que alrededor de un 80% de los LPMs recuperables a este tiempo de la infección habían capturado *E. coli* (8×10^5), se puede concluir que alrededor de 6×10^6 bacterias fueron internalizadas por estos macrófagos y que, por tanto, los LPMs llevan a cabo una eficaz

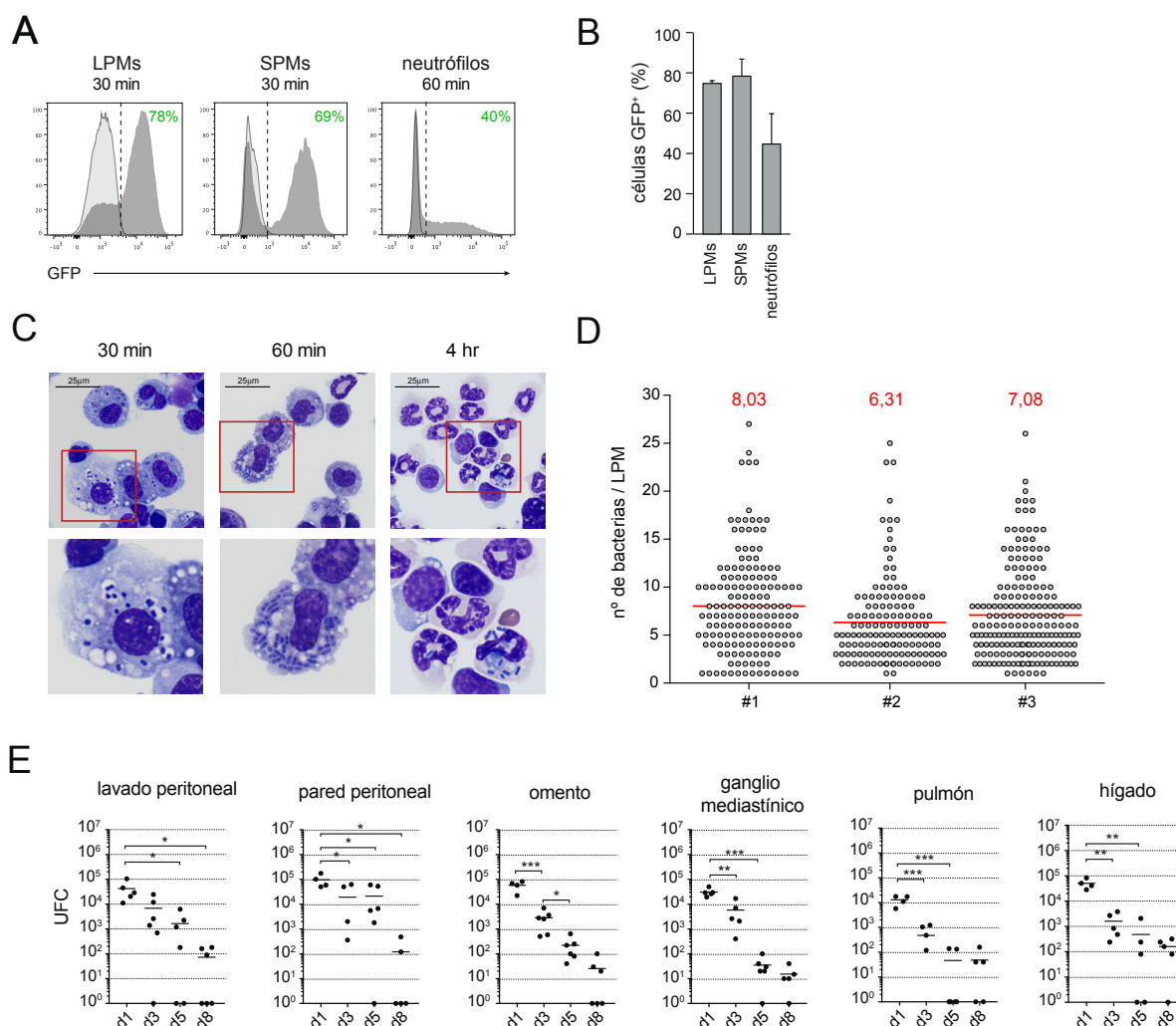


Figura 3. Los LPMs internalizan la mayor parte de la bacteria presente en la cavidad peritoneal en los primeros minutos postinfección.

(A) Análisis mediante citometría de flujo y (B) cuantificación del porcentaje de LPMs, SPMs o neutrófilos GFP⁺ presentes en el lavado peritoneal, a los 30 (LPMs y SPMs) ó 60 minutos (neutrófilos) tras la inoculación i.p. de *E. coli*-GFP. Los perfiles en gris oscuro se corresponden con la expresión de GFP; los perfiles en gris claro se corresponden con la señal de autofluorescencia presente en estas poblaciones tras la infección i.p. con *E. coli*. (C) Análisis de muestras citocentrífugadas de lavado peritoneal obtenidas a los tiempos indicados p.i. y que fueron posteriormente teñidas con Giemsa (aumento de imágenes en fila inferior). (D) Cuantificación del número de bacterias presentes en los LPMs presentes en las muestras citocentrífugadas de lavado peritoneal a los 30 minutos p.i. Cada bacteria detectada en el interior de un LPM es representada por un punto. Los datos mostrados provienen de tres muestras de lavados peritoneales independientes (#1, #2, #3). La línea roja representa el valor medio de bacterias cuantificadas por LPM. (E) Análisis de la carga bacteriana detectada en lavado peritoneal, pared peritoneal, omento, ganglio mediastínico, pulmón e hígado entre día 1 y día 8 p.i. Cada punto representa las unidades formadoras de colonias (UFCs) cuantificadas por órgano completo y animal. Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

internalización y eliminación de la bacteria, contribuyendo en gran medida a la reducción de la carga bacteriana de la cavidad peritoneal durante la primera hora p.i.

Por otro lado, a pesar de que los LPMs son capaces de internalizar gran parte de parte de las bacterias presentes en la cavidad peritoneal, se detectó en omento, pared peritoneal, ganglio mediastínico, así como en pulmón e hígado (los principales órganos diana tras la infección ip. con *E. coli*) una carga bacteriana de 1×10^4 - 1×10^5 UFCs a las 24 horas p.i. (Figura 3E). La infección fue progresivamente siendo erradicada durante la primera semana p.i, detectándose a día 8 menos de 1×10^2 UFCs en los órganos intra- y extra-abdominales analizados (Figura 3E).

Caracterización del proceso de desaparición de los LPMs durante la infección intraperitoneal con *E. coli* (MDR)

Como se ha descrito en el apartado anterior, durante los primeros minutos postinfección la población de LPMs era responsable de la eliminación de gran parte de la infección, proceso que transcurría simultáneamente con el fenómeno de MDR (Figura 2B-2C). En este sentido, nos planteamos si el proceso de MDR reflejaba, como ha sido propuesto en otros modelos experimentales, que los macrófagos residentes morían a consecuencia de la infección (Blériot et al., 2015). Por ello decidimos analizar la cinética de los LPMs a tiempos más tardíos de la infección mediante citometría de flujo.

En estos experimentos también se cuantificó

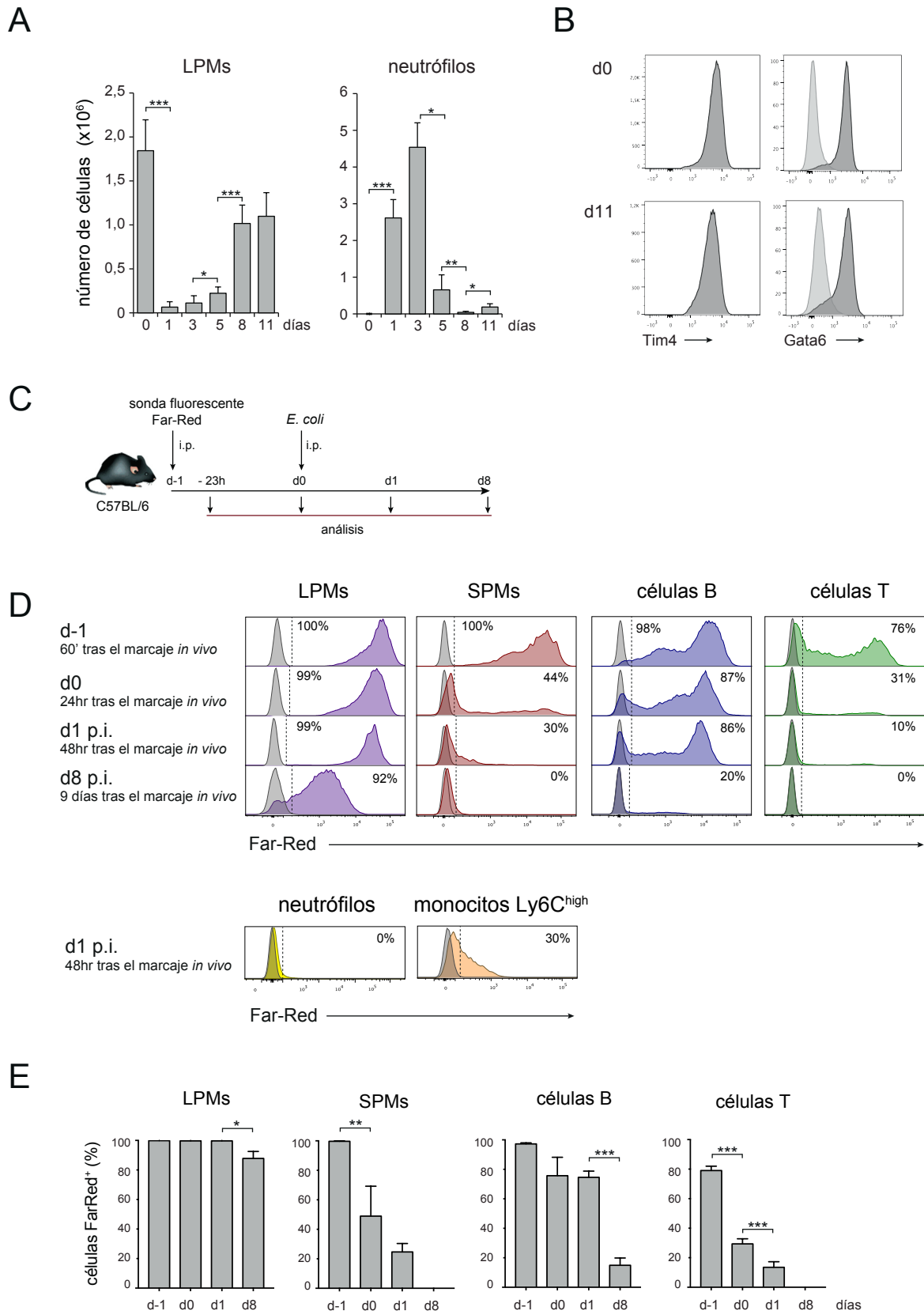
el número de neutrófilos presentes en la cavidad peritoneal como parámetro indicativo del estado inflamatorio, puesto que los neutrófilos son reclutados al órgano diana en el inicio de las respuestas inflamatorias y, a medida que la inflamación se resuelve, son progresivamente eliminados (Gautier et al., 2013). Los resultados obtenidos mostraron que, a día 1 p.i., el número de LPMs recuperables al realizar el lavado peritoneal era, al igual que observamos a 4 horas p. i., aún muy reducido, así como se observó un importante reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal (Figura 4A).

Los análisis llevados a cabo a tiempos posteriores mostraron que, a medida que la infección se resolvía, y los neutrófilos y la carga bacteriana en la cavidad peritoneal se reducían hasta ser casi indetectables, el número de LPMs recuperables al realizar un lavado peritoneal fue incrementándose progresivamente, alcanzando a día 11, alrededor de un 60-70% del número de LPMs presentes en condiciones de reposo (Figura 4A). La población de LPMs observada a día 11 p.i. expresaba el receptor de fosfatidil serina Tim4 y el factor de transcripción Gata6, dos marcadores prototípicos de la población de LPMs en reposo (Figura 4B).

Tal y como se ha descrito en la Introducción, los LPMs son macrófagos residentes que se caracterizan por tener una larga vida media y por ser una población que, en condiciones de reposo, se mantiene en el tejido mediante autoproliferación. Puesto que nuestros datos mostraban que la población de LPMs se recuperaba a medida que se resolvía la infección, valoramos si la población de LPMs observada a día 11 era, o provenía, de la población presente en

Figura 4. Dinámica de la población de LPMs en el curso de la infección i.p. con *E.coli*. (página siguiente)

(A) Número absoluto de LPMs y neutrófilos detectados en el lavado peritoneal a los tiempos indicados tras la infección con *E. coli*. Análisis realizado mediante citometría de flujo. (B) Nivel de expresión de Tim4 y Gata6 en la población de LPMs presente en condiciones de reposo (d0) y 11 días (d11) tras la infección bacteriana. Los perfiles en gris oscuro se corresponden con la expresión de Gata6 mientras que los perfiles en gris claro se corresponden con el marcaje basal con un anticuerpo control de isotipo. (C) Protocolo de marcaje *in vivo* de las células presentes en la cavidad peritoneal con la sonda fluorescente CellTrace Far Red 24 horas antes de la inoculación de *E. coli*. Se realizó el análisis del lavado peritoneal 60 minutos y 24 horas tras la inoculación de la sonda, y a días 1 y 8 p.i. (D) Análisis por citometría de flujo y (E) cuantificación de la señal Far Red⁺ detectada en LPMs, SPMs, células B, células T, neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} a los tiempos indicados p.i. Los perfiles en gris se corresponden con la señal observada en la población de LPMs presente en el lavado peritoneal de ratones a los que no se administró la sonda fluorescente. Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3-4 experimentos independientes.



condiciones de reposo, o si alternatively había sido eliminada como consecuencia de la infección y formada *de novo*. Con este propósito, se llevó a cabo un experimento que nos permitió monitorizar la

población de LPMs presentes en la cavidad peritoneal al inicio de la infección y durante el curso de esta. Para ello se administró intraperitonealmente la sonda fluorescente CellTrace™ Far Red con el fin de marcar

las células presentes en la cavidad peritoneal en condiciones de reposo, de acuerdo con el protocolo descrito en la (Figura 4C).

La sonda CellTrace™ Far Red se administró 24 horas antes de inocular la bacteria y, a diferentes tiempos postinfección, se monitorizó la dinámica de las diferentes poblaciones celulares recuperables en el lavado peritoneal, mediante citometría de flujo. En primer lugar, con el fin de evaluar la eficacia del marcaje con la sonda fluorescente, analizamos el lavado peritoneal 60 minutos tras administrar la sonda (24 horas antes de la inoculación bacteriana) (Figura 4D-4E).

Estos análisis mostraron que el 100% de los LPMS, SPMs y células B eran Far Red⁺, mientras que sólo lo eran alrededor de un 75% de las células T, lo que probablemente refleja el rápido recambio de estas células (Figura 4D-4E). Un día más tarde, y antes de la infección, prácticamente el 100% de los LPMs mantenía el marcaje, mientras que alrededor del 90% de las células B, el 40% de los SPMs y, únicamente un 30% de la población de células T, eran Far Red⁺. A día 1 p.i., los LPMs que se recuperaron en el lavado peritoneal mantenían el marcaje fluorescente Far Red⁺. Alrededor de un 85% de las células B que se detectaron eran Far Red⁺, mientras que solo un 10 y un 30% de las células T y los SPMs respectivamente eran Far Red⁺ (Figura 4D-4E), de acuerdo con datos previos que demuestran la alta tasa de recambio de los SPMs (Bain et al., 2016).

A día 8 p.i., fase en la que el 60-70% de la población de LPMs era recuperable en la cavidad peritoneal (Figura 4A), observamos que alrededor de un 90% de estos macrófagos seguían marcados con la sonda fluorescente Far Red, mientras que el resto de las células mieloides presentes en la cavidad peritoneal, eran Far Red⁻ (Figura 4D-4E). Es importante mencionar que los neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} reclutados a la cavidad peritoneal en los primeros estadios del proceso infeccioso no mostraron señal de Far Red (Figura 4D), salvo un pequeño porcentaje de monocitos que presentaban una señal débil. Este

hecho excluiría, por tanto, que los LPMs observados a tiempos tardíos de la infección (día 8) derivaran de los monocitos reclutados al peritoneo como consecuencia de la infección.

Por tanto, estos datos indican, que en nuestro modelo de infección con *E. coli*, la desaparición de los LPMs no puede explicarse porque hayan sido eliminados a consecuencia del proceso infeccioso dado que los LPMs presentes antes de la infección son de nuevo detectables tras el MDR.

LA INFECCIÓN INTRAPERITONEAL CON *E. COLI* INDUCE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE MACRÓFAGOS SOBRE LA SUPERFICIE DE LA PARED PERITONEAL

La reacción de desaparición de los macrófagos (MDR) responde a la adhesión de los LPMs al mesotelio peritoneal

Se han propuesto distintos mecanismos que podrían explicar la desaparición de los LPMs durante el fenómeno de MDR, que incluyen la muerte de estas células a consecuencia del proceso infeccioso, su migración al ganglio linfático que drena la cavidad peritoneal, o bien la adhesión transitoria de los LPMs a la superficie peritoneal.

Puesto que nuestros resultados indicaban que la población de LPMs detectada a día 11 de la infección correspondía a los macrófagos presentes en condiciones de reposo, decidimos explorar si la infección intraperitoneal con *E. coli* inducía la adhesión transitoria de los LPMs al mesotelio que recubre la cavidad peritoneal. Como se ha citado en el apartado de Introducción, la cara luminal de la cavidad peritoneal está cubierta por el mesotelio, una monocapa de células mesoteliales estrechamente unidas entre sí, formando un pavimento continuo que cubre no solo la cavidad peritoneal, sino también las cavidades pleural y pericárdica. Con el fin de valorar si la desaparición de los LPMs reflejaba una adhesión de éstos al mesotelio, analizamos la pared peritoneal de ratones infectados con *E. coli* mediante la técnica

whole mount immunofluorescence (WMI), para lo cual, la pared peritoneal completa fue marcada con anticuerpos fluorescentes, y posteriormente analizada mediante microscopía confocal, de acuerdo con el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Nuestros resultados mostraron que tras 4 horas p.i., es decir cuando los LPMs no eran detectables en el lavado peritoneal, la cara luminal de la pared peritoneal estaba cubierta por grandes agregados de células F4/80⁺ (Figura 5A), marcador de macrófagos

residentes. Los análisis por microscopía confocal mostraron que, en estos agregados, los macrófagos F4/80⁺ se apoyaban sobre la monocapa de células mesoteliales, identificadas por la expresión de podoplanina (Figura 5A-5B). El tamaño de los agregados de macrófagos era variable, pudiéndose observar desde pequeñas agrupaciones formadas por un número reducido de células F4/80⁺, hasta agregados densos y compactos de más de 800 micras de extensión (Figura 5B-5B1). Es importante señalar que también se detectaron, tal y como se muestra en

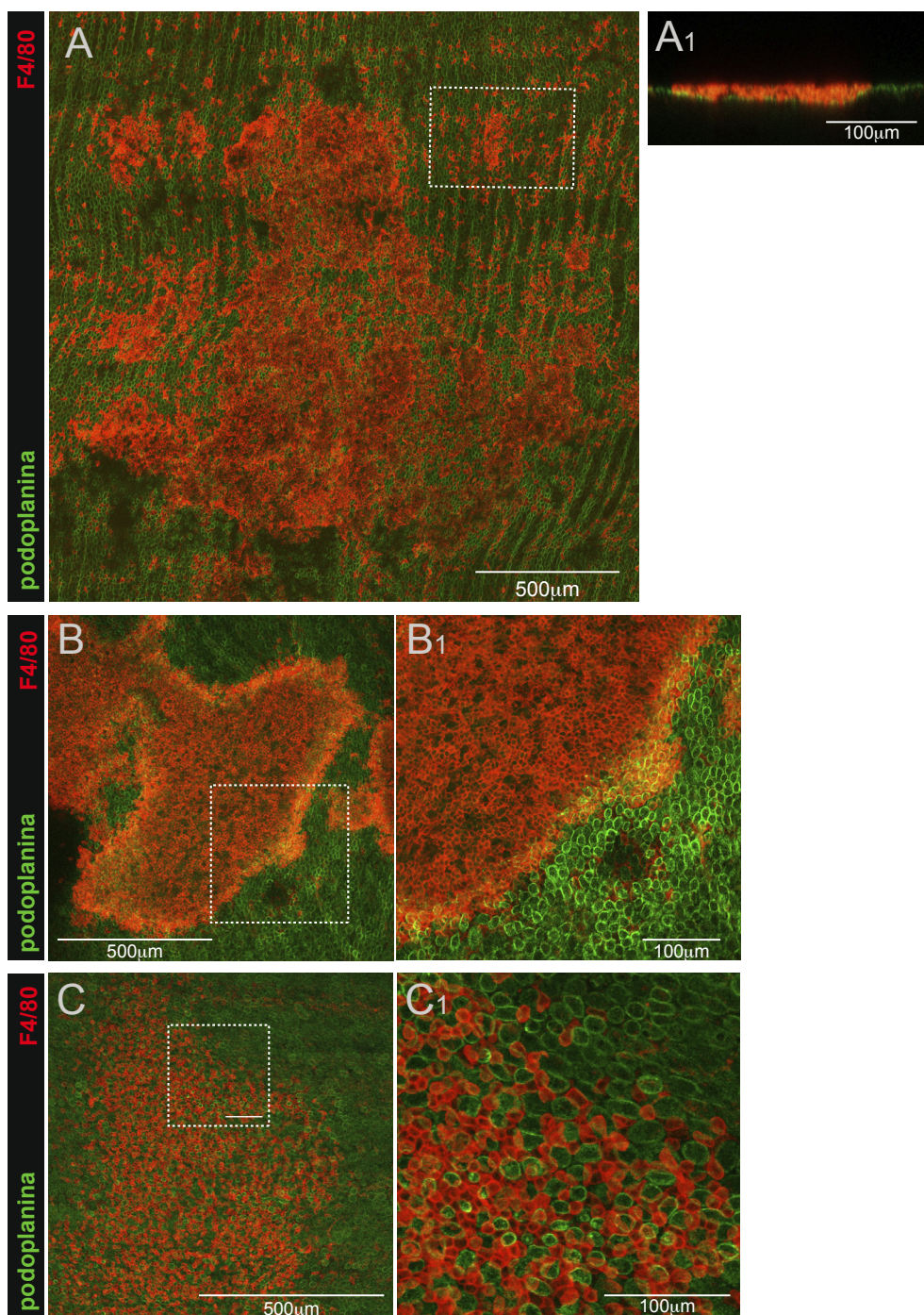


Figura 5. Los macrófagos F₄/80⁺ se adhieren a la superficie del mesotelio que tapiza la pared peritoneal en las primeras horas tras la infección con *E.coli*. (página anterior)

(A) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de los agregados de macrófagos (F₄/80⁺) formados sobre el mesotelio que limita la pared peritoneal (podoplanina⁺) 4 horas tras la inoculación de *E. coli*. (A₁) Vista ortogonal de un agregado de macrófagos (F₄/80⁺) sobre el mesotelio parietal (podoplanina⁺) tras la administración de la bacteria. Los macrófagos forman agregados compactos y de gran extensión (B-B₁) así como algunos permanecen dispersos sobre la barrera mesotelial (C-C₁). Datos similares fueron obtenidos al menos en 4-5 experimentos independientes.

la Figura 5C-C₁, macrófagos dispersos sobre la pared peritoneal.

Cabe mencionar que no se detectaron estos agregados de macrófagos sobre la pared peritoneal de ratones no infectados, lo que sugeriría que los macrófagos F₄/80⁺ que formaban los agregados observados en ratones infectados, correspondían a los LPMs que, en respuesta a la infección, se habían adherido a la pared peritoneal y, a consecuencia de ello, no eran recuperables al realizar un lavado peritoneal. En este sentido, los macrófagos F₄/80⁺ presentes en estos agregados expresaban Tim4 receptor que, como se ha comentado anteriormente, es un marcador prototípico de la población de LPMs (Figura 6A-A₁).

Con el fin de determinar si los LPMs detectados en el lavado peritoneal formaban dichas estructuras, desarrollamos una estrategia experimental basada en la transferencia de células de lavado peritoneal, que nos permitió monitorizar a los LPMs durante el proceso infeccioso (Figura 6B). Para ello, las células obtenidas mediante lavado peritoneal se marcaron utilizando la sonda fluorescente CFSE, y fueron transferidas intraperitonealmente a ratones C57BL/6, 24 horas antes la infección intraperitoneal con *E. coli*.

Trascurrido ese tiempo se inoculó la bacteria y, 4 horas más tarde, el lavado y la pared peritoneales fueron analizados mediante citometría de flujo y microscopía confocal, respectivamente (Figura 6B). Tanto la población de LPMs endógena (CFSE⁻), como la población de LPMs transferida (CFSE⁺) sufrieron una reducción comparable en el lavado peritoneal a consecuencia de la infección (Figura 6C). Por otra parte, los análisis de la pared peritoneal mediante microscopía confocal revelaron que los LPMs transferidos (CFSE⁺) formaban parte de los agregados

de macrófagos endógenos (CFSE⁻), demostrando con ello, que las agrupaciones de macrófagos observadas estaban formadas principalmente por LPMs, que se adherían transitoriamente a la pared peritoneal durante la primera fase del proceso infeccioso (Figura 6D-D₁). En conclusión, estos resultados ponen de manifiesto que la infección intraperitoneal con *E. coli* induce la adhesión temprana de los LPMs, que forman agregados sobre la superficie mesotelial de la pared peritoneal.

En base con los datos previamente descritos, que indicaban que la mayor parte de los LPMs recuperables en el lavado peritoneal habían internalizado eficazmente *E. coli* en los primeros minutos p.i y que, a medida que progresaba el proceso infeccioso, estos macrófagos formaban agregados de gran extensión sobre la superficie de la pared peritoneal, decidimos valorar si los LPMs que formaban estos agregados contenían *E. coli* en su interior. Para ello analizamos mediante microscopía confocal las paredes de ratones infectados con *E. coli*-GFP. Estos análisis revelaron que los LPMs que formaban parte de los acúmulos contenían numerosas bacterias en su citoplasma y que la presencia de las bacterias estaba restringida a estos agregados. Por otra parte, cabe mencionar que no se observó señal GFP ni en células F₄/80⁺ ni en áreas de mesotelio desprovistas de macrófagos adheridos (Figura 7A-7B).

Los acúmulos multicelulares formados sobre la pared peritoneal durante la infección bacteriana desestabilizan la barrera mesotelial

Durante las primeras horas postinfección, la captura del patógeno por parte de los macrófagos es concomitante con la formación de agregados sobre la pared peritoneal. En esta primera fase del

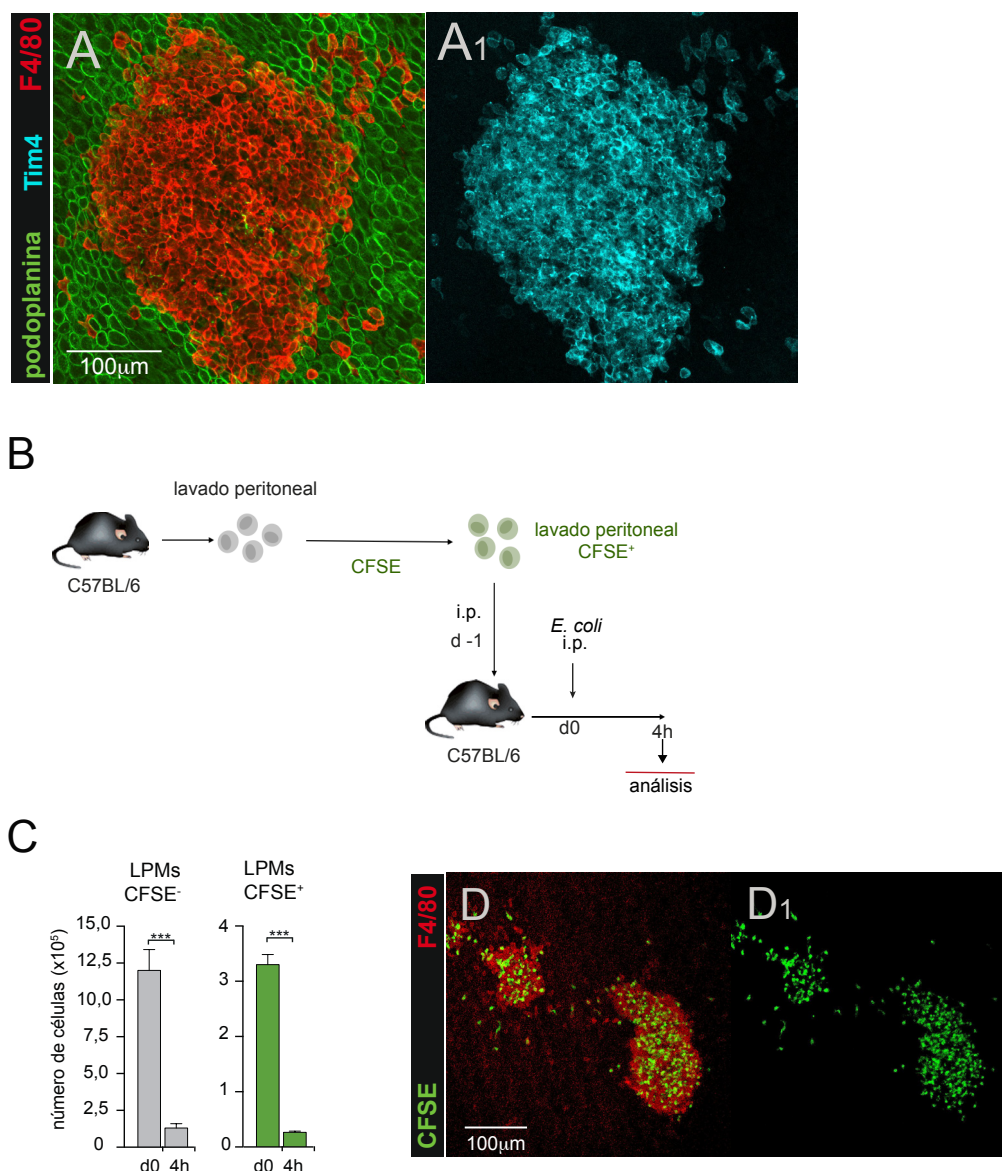


Figura 6. Los macrófagos localizados en los agregados formados sobre el mesotelio peritoneal corresponden a la población de LPMs.

(A) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la expresión de Tim4 en los agregados de macrófagos (F4/80⁺) formados sobre el mesotelio de la pared peritoneal (podoplanina⁺). (B) Protocolo de transferencia i.p. de células de lavado peritoneal marcadas previamente con la sonda fluorescente CFSE, a ratones C57BL/6, 1 día antes del inicio del proceso infeccioso. Tras la inoculación i.p. de *E. coli*, el lavado y la pared peritoneal fueron analizados mediante citometría de flujo y microscopía confocal. (C) Cuantificación del número de LPMs endógenos (CFSE⁻) y transferidos (CFSE⁺) en el lavado peritoneal, tanto en condiciones de reposo como 4 horas p.i. siguiendo con el protocolo descrito en (B). (D) Análisis de la presencia de LPMs transferidos (CFSE⁺) en los agregados de macrófagos endógenos (CFSE⁻) sobre la pared peritoneal. Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. ***p<0.001; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares fueron obtenidos al menos por en 3 experimentos independientes.

proceso infeccioso también se produce un fuerte reclutamiento de células inflamatorias a la cavidad peritoneal y, por ello, nos planteamos explorar si otras poblaciones celulares también formaban parte de los acúmulos de macrófagos formados sobre el mesotelio. Los análisis de pared peritoneal mediante

microscopía óptica y microscopía electrónica (Figura 7C-C1; 7D) mostraron que los agregados estaban constituidos por diversos tipos celulares que se superponían en varias capas de células (hasta 5-7) sobre el mesotelio peritoneal (Figura 7C-C1; 7D). En estas preparaciones identificamos, en base a

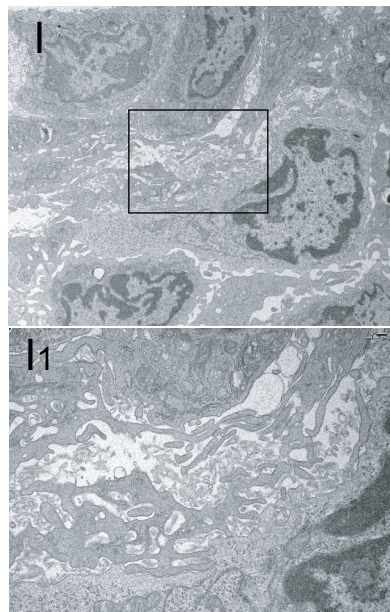
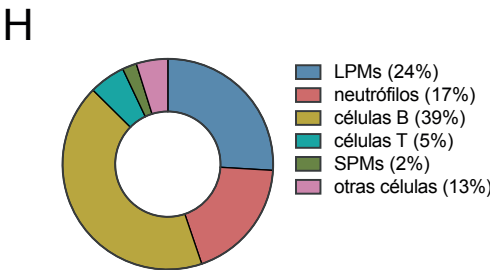
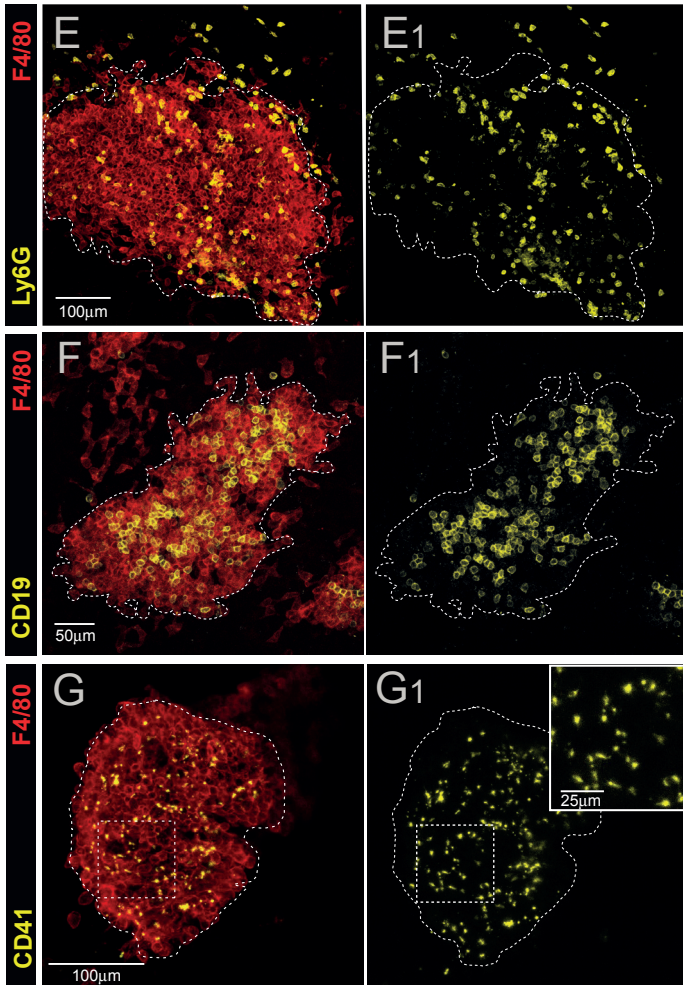
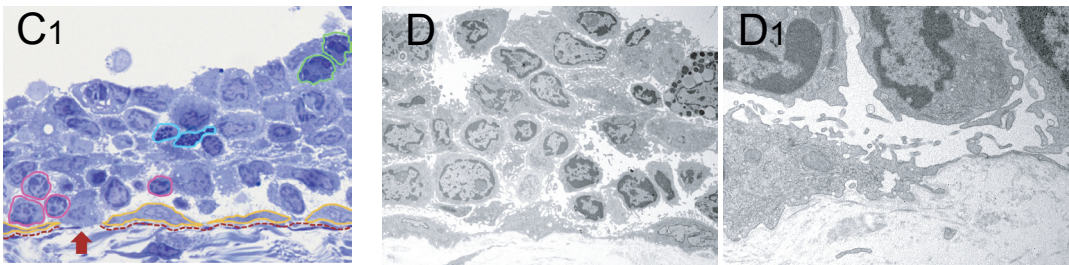
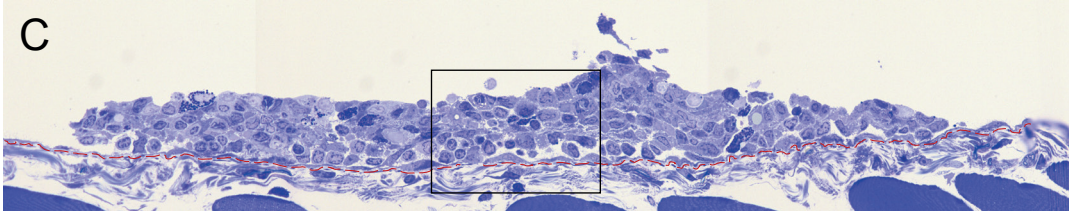
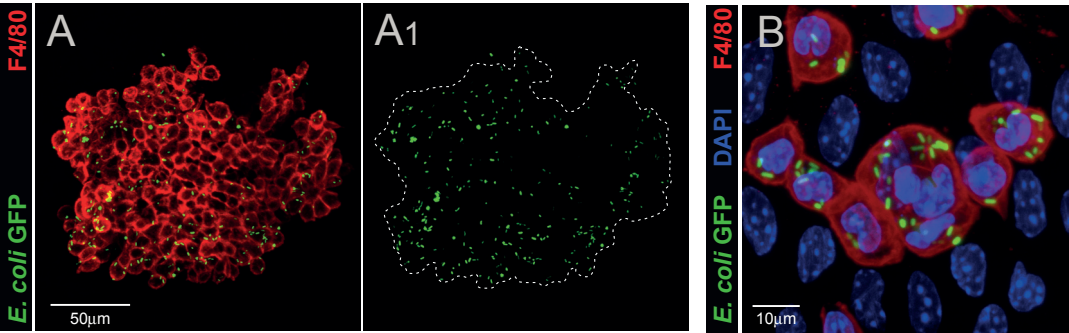


Figura 7. La infección bacteriana induce la formación de agregados multicelulares sobre la barrera mesotelial. (página anterior)

(A y B) Detección de bacteria (*E. coli*-GFP) en los agregados de macrófagos (F4/80⁺) encontrados sobre la pared peritoneal 2 horas p.i., mediante WMI y microscopía confocal. (C) Corte semifino de pared peritoneal, de 800 nm de espesor, teñido con azul de toluidina, que muestra un agregado multicelular sobre la superficie del mesotelio peritoneal (línea roja discontinua) 4 horas tras la inoculación i.p. de *E. coli*. (C1) Magnificación del corte indicada en (C) que muestra las diferentes poblaciones celulares que constituyen el agregado (en naranja: células mesoteliales; en rosa: linfocitos; en azul: mastocitos; en verde: neutrófilos), así como la presencia discontinuidades en la barrera mesotelial (flecha roja) en la zona del agregado. (D) Análisis mediante microscopía electrónica de cortes ultrafinos de pared peritoneal de 70 nm de espesor que muestran la presencia de numerosos filopodios en los macrófagos que constituyen el agregado a las 4 horas p.i. Análisis de la presencia de (E) neutrófilos (Ly6G⁺), (F) células B (CD19⁺) y (G) plaquetas (CD41⁺) en los agregados de macrófagos presentes en la pared peritoneal 4 horas p.i. (H) Cuantificación mediante citometría de flujo de las principales poblaciones de células hematopoyéticas presentes en los agregados de macrófagos, los cuales fueron aislados de acuerdo con el procedimiento descrito en Materiales y Métodos, 4 horas tras la inoculación i.p. de *E. coli*. (I) Análisis mediante microscopía electrónica de cortes ultrafinos de 70 nm de espesor de la pared peritoneal, que muestran la presencia depósitos fibrosos entre las células que forman el agregado. Datos similares fueron obtenidos al menos en 3 experimentos independientes.

su morfología, neutrófilos, linfocitos, mastocitos y mayoritariamente macrófagos, caracterizados por la presencia de numerosos filopodios en su superficie (Figura 7C-C1; 7D-D1), lo que sugeriría que estas células presentan una alta motilidad en el seno de los agregados.

Los análisis de agregados de macrófagos por citometría de flujo, tras su disgregación mediante digestión enzimática de acuerdo con el protocolo descrito en Materiales y métodos, pusieron de manifiesto que los agregados estaban compuestos en un 80% por macrófagos, células B y neutrófilos mientras que el 20% restante incluía principalmente células T y SPMs (Figura 7H). Estos datos fueron confirmados mediante los análisis llevados a cabo mediante microscopía confocal que confirmaron la presencia de : numerosos neutrófilos (Ly6G⁺) en los acúmulos de macrófagos (de acuerdo con el fuerte reclutamiento de esta población inflamatoria durante las primeras horas p.i.) (Figura 7E-E1); una población significativa de células B (CD19⁺), población muy abundante en el lavado peritoneal en condiciones de reposo (Figura 7F-F1); así como plaquetas, caracterizadas por su expresión de CD41 (Figura 7G-G1).

La presencia de plaquetas en los agregados (Figura 7G-G1) podría contribuir a la agregación de estas células sobre la pared peritoneal. En este sentido, los análisis realizados mediante microscopia electrónica de pared peritoneal mostraron la presencia de material fibroso entre las células que forman parte del agregado, que podría corresponder

con fibrina o fibrinógeno (Figura 7I-I1). En línea con estos datos, los análisis preliminares llevados a cabo tras la administración de un agente fibrinolítico (heparina) mostraron una inhibición parcial del fenómeno de MDR, lo que sugeriría que la formación de fibrina podría contribuir a la agregación de las células peritoneales sobre la superficie del mesotelio.

Los análisis de las secciones semifinas de pared peritoneal en condiciones de reposo (Figura 8A) mostraron que las células mesoteliales que conformaban el mesotelio presentaban una morfología plana y alargada, y estaban íntimamente unidas entre sí, tal y como confirmaron los análisis realizados mediante microscopía confocal con el marcaje anti- podoplanina y anti-ZO-1 (uniones estrechas) (Figura 8B-B2). Sin embargo, los análisis llevados a cabo mediante microscopía óptica 4 horas p.i. indicaron que las células mesoteliales presentaban una morfología más abultada, con un núcleo prominente, abundante citoplasma (Figura 7C-C1, flecha roja) y discontinuidades entre ellas (Figura 7C-C1). Los análisis llevados a cabo mediante microscopía confocal confirmaron estos datos, pues revelaron que las uniones estrechas estaban muy alteradas en la zona del agregado y en zonas próximas a este a las 4 horas p.i., tal y como puso de manifiesto el marcaje con anti-ZO-1 (Figura 8C).

El fenómeno de MDR es independiente del reclutamiento de monocitos y neutrófilos a la cavidad peritoneal

En siguiente lugar, decidimos analizar si la

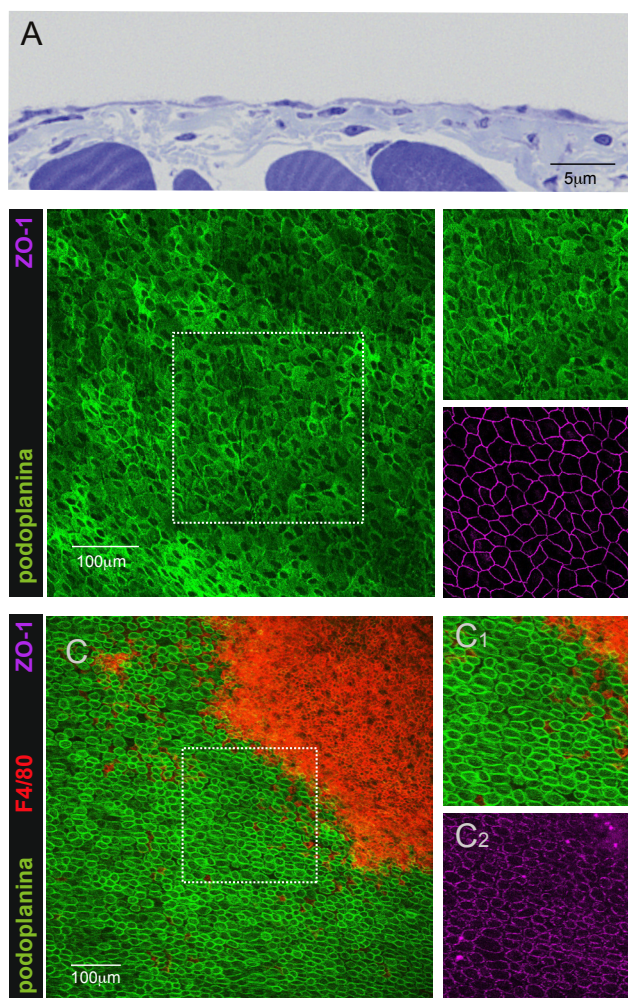


Figura 8. La formación de agregados desestabiliza la barrera mesotelial.

(A) Corte semifino de 800 nm de espesor de pared peritoneal en condiciones de reposo teñido con azul de toluidina. (B y C) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la expresión de ZO-1 (uniones estrechas) en las células mesoteliales (podoplanina*) de la pared peritoneal (B) en condiciones de reposo y (C) 4 horas tras la infección i.p. con *E. coli*. Datos similares fueron obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

desaparición de los LPMs observada durante la infección era dependiente del reclutamiento células inflamatorias (monocitos y neutrófilos) a la cavidad peritoneal. Para abordar dicha hipótesis, utilizamos animales deficientes en CCR2 (CCR2^{-/-}), receptor de quimioquinas que controla la salida de los monocitos Ly6C^{high} desde la médula ósea a la circulación periférica, de modo que, los monocitos inflamatorios no serían reclutados a la cavidad peritoneal durante la infección con *E. coli*. Los análisis del lavado peritoneal de ratones CCR2^{-/-}, 24 horas p.i., pusieron de manifiesto que el bloqueo en el reclutamiento de monocitos a la cavidad peritoneal no alteraba la

desaparición de la población de LPMs (Figura 9A-9B).

Con el fin de evaluar si el reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal tenía un papel en el MDR, diseñamos una estrategia experimental basada en la administración i.p. a ratones C57BL/6 de un anticuerpo monoclonal citotóxico (GR1) que reconoce las moléculas Ly6C, expresadas por los monocitos y neutrófilos, y Ly6G expresadas únicamente por los neutrófilos; 12 y 2 horas antes del inicio de la infección (Figura 9C). Trascurrido ese tiempo, inoculamos la bacteria y el lavado peritoneal y la sangre fueron analizados mediante citometría de flujo (Figura 9C). Los resultados obtenidos mostraron una significativa reducción en el número de neutrófilos tanto en sangre como en la cavidad peritoneal que, sin embargo, no afectó al fenómeno de MDR (Figura 9D-9F). Por tanto, la desaparición transitoria de los LPMs durante el proceso infeccioso era independiente del reclutamiento de neutrófilos y monocitos a la cavidad peritoneal.

Del mismo modo, decidimos abordar si el receptor TLR4 (que reconoce el lipopolisacárido presente en la pared de bacterias gram negativas como *E. coli*), el adaptador MyD88 (involucrado en la señalización por todos los TLRs a excepción de TLR3) o la activación del inflamósoma NLRP3, podrían participar en el fenómeno de MDR. Para ello, ratones deficientes en TLR4, MyD88 o NLRP3 fueron infectados intraperitonealmente con *E. coli*, y las células presentes en el lavado peritoneal fueron analizadas mediante citometría de flujo (Figura 9G). En los tres modelos, la infección intraperitoneal con *E. coli* inducía una desaparición de la población de LPMs comparable a la observada en ratones control, indicando por tanto que estas vías de señalización no tenían un papel esencial en el MDR inducido por la infección con *E. coli* (Figura 9G).

Por otro lado, evaluamos si IL-1 α e IL-1 β , dos de las principales citoquinas producidas durante una reacción inflamatoria en la cavidad peritoneal (Dioszeghy et al., 2008; Eigenbrod et al., 2008), estaban involucradas en el fenómeno de MDR

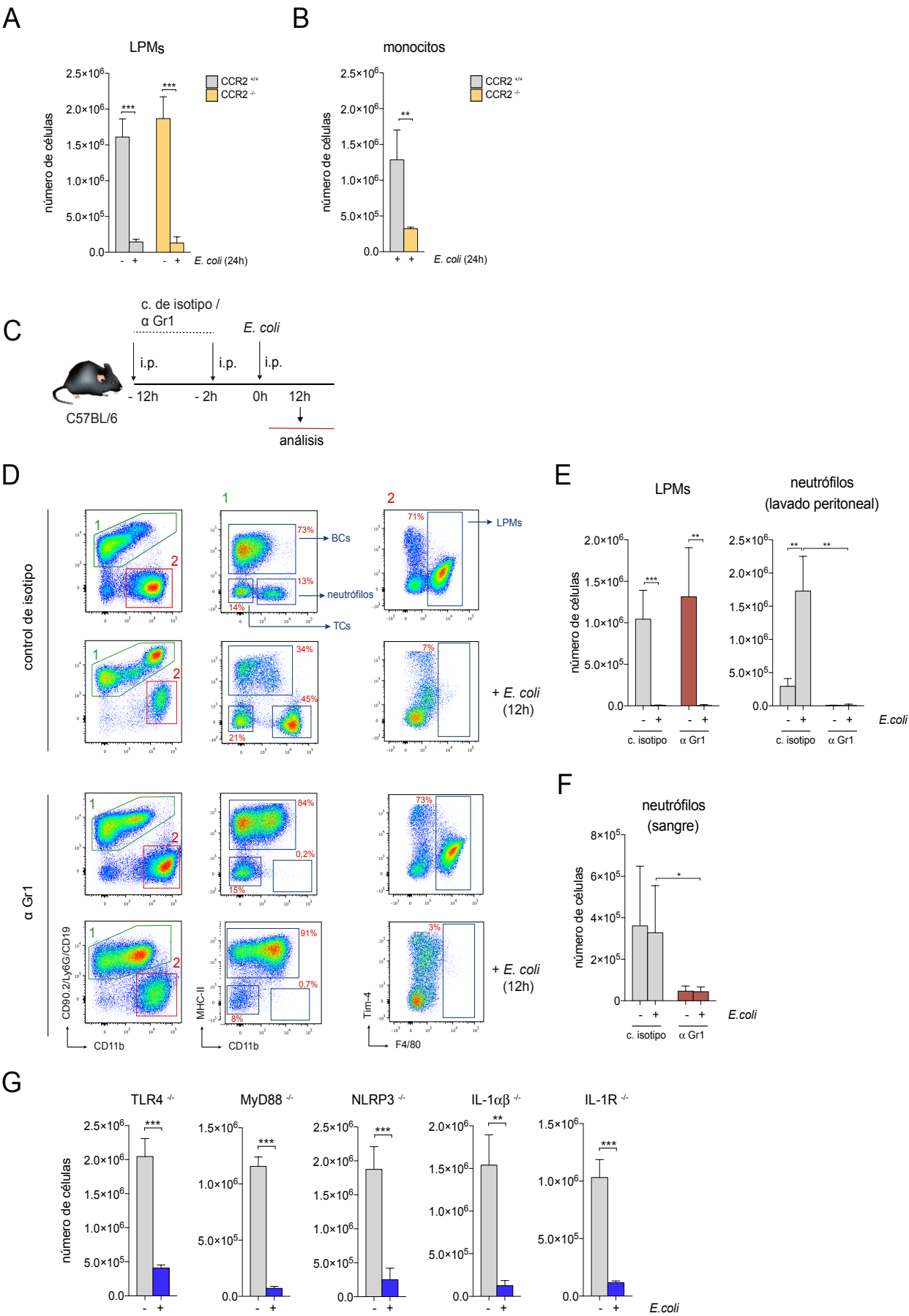


Figura 9. El fenómeno de MDR es independiente del reclutamiento de neutrófilos y monocitos a la cavidad peritoneal, y de la señalización a través de TLR4, MyD88, NLRP3 o IL-1R, o mediada por IL-1 α / β . (página anterior) (A y B) Número absoluto de LPMs y monocitos detectado en el lavado peritoneal de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-} en condiciones de reposo 24 horas tras la infección i.p. con *E. coli*. (C) Protocolo de administración del anticuerpo monoclonal anti-Gr1, o del control de isotipo correspondiente, utilizado para el bloqueo del reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal durante la infección con *E. coli*. El análisis del lavado peritoneal se realizó 12h tras la infección i.p. con *E. coli*. (D) Análisis mediante citometría de flujo y (E) cuantificación de la población de LPMs y neutrófilos en la cavidad peritoneal, así como (F) de la población de neutrófilos presentes en sangre, 12 horas tras el inicio del proceso infeccioso, de acuerdo con el protocolo descrito en (C). (G) Número absoluto de LPMs presentes en el lavado peritoneal de ratones deficientes en TLR4, MyD88, NLRP3, IL-1 α e IL-1 β así como en el receptor de IL-1 en condiciones de reposo y 24h tras la infección i.p. con *E. coli*, cuantificado mediante citometría de flujo. Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

inducido por *E. coli*. Para ello analizamos el lavado peritoneal de ratones deficientes en IL-1 α e IL-1 β (IL-1 $\alpha\beta$ ^{-/-}), o en su receptor (IL-1R^{-/-}) a las 24 horas p.i. Los resultados obtenidos en estos análisis mostraron una reducción significativa en el número LPMs detectados en el lavado peritoneal de los ratones IL-1 $\alpha\beta$ ^{-/-} y IL-1R^{-/-}, semejante a la descrita en ratones control, indicando por tanto que ni IL-1 α ni IL-1 β desempeñan un papel fundamental en el fenómeno de MDR (Figura 9G).

ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE MACROFAGOS SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS ÓRGANOS PERITONEALES EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *E. COLI*

Nuestros datos han puesto de manifiesto que durante las primeras horas tras la infección intraperitoneal con *E. coli* se forman agregados de macrófagos sobre el mesotelio que cubre la pared peritoneal. Puesto que el mesotelio peritoneal, además de delimitar la pared peritoneal, recubre la cara luminal de los órganos localizados en la cavidad peritoneal, decidimos analizar si la infección bacteriana inducía también la adhesión de los LPMs al mesotelio que reviste estos órganos.

La infección intraperitoneal con *E. coli* induce la formación de agregados de LPMs en el omento

En primer lugar, abordamos la posible formación de agregados de macrófagos sobre la superficie del omento, órgano peritoneal que ha

recibido especial atención en los últimos años puesto que participa en la inmunidad innata de la cavidad peritoneal. Los análisis llevados a cabo mediante WMI y microscopía confocal mostraron que, a las 4 horas p.i., la superficie del omento estaba cubierta por agregados de células F4/80⁺ (Figura 10A), que expresaban el receptor de fosfatidil serina Tim4 (Figura 10A1).

Con el fin de abordar si, como habíamos demostrado en el caso de la pared peritoneal, estos macrófagos observados sobre la superficie del omento correspondían a los LPMs, llevamos a cabo la estrategia experimental descrita anteriormente basada en la transferencia i.p. de células de lavado peritoneal marcadas fluorescentemente, 24 horas antes de inducir la infección. Los análisis de omento mediante WMI y microscopía confocal llevados a cabo tras 4 horas p.i. mostraron que los macrófagos transferidos (CFSE⁺) actuaban de manera comparable a los macrófagos endógenos (CFSE⁻) (Figura 10B-B2), formando agregados compactos y densos sobre la superficie del omento, acúmulos que eran semejantes a los observados sobre el mesotelio que cubre la pared peritoneal (Figura 10C). Por tanto, estos datos sugerían que la infección bacteriana inducía también la migración de los LPMs al omento.

Para darle más peso a esta hipótesis, administramos *in vivo* la sonda fluorescente CFSE (Figura 10D), que nos permitía selectivamente distinguir las células presentes en la cavidad peritoneal (que se marcaron con la sonda fluorescente CFSE) de aquellas presentes en el omento (que no se marcaron con la sonda fluorescente). Los análisis de omento

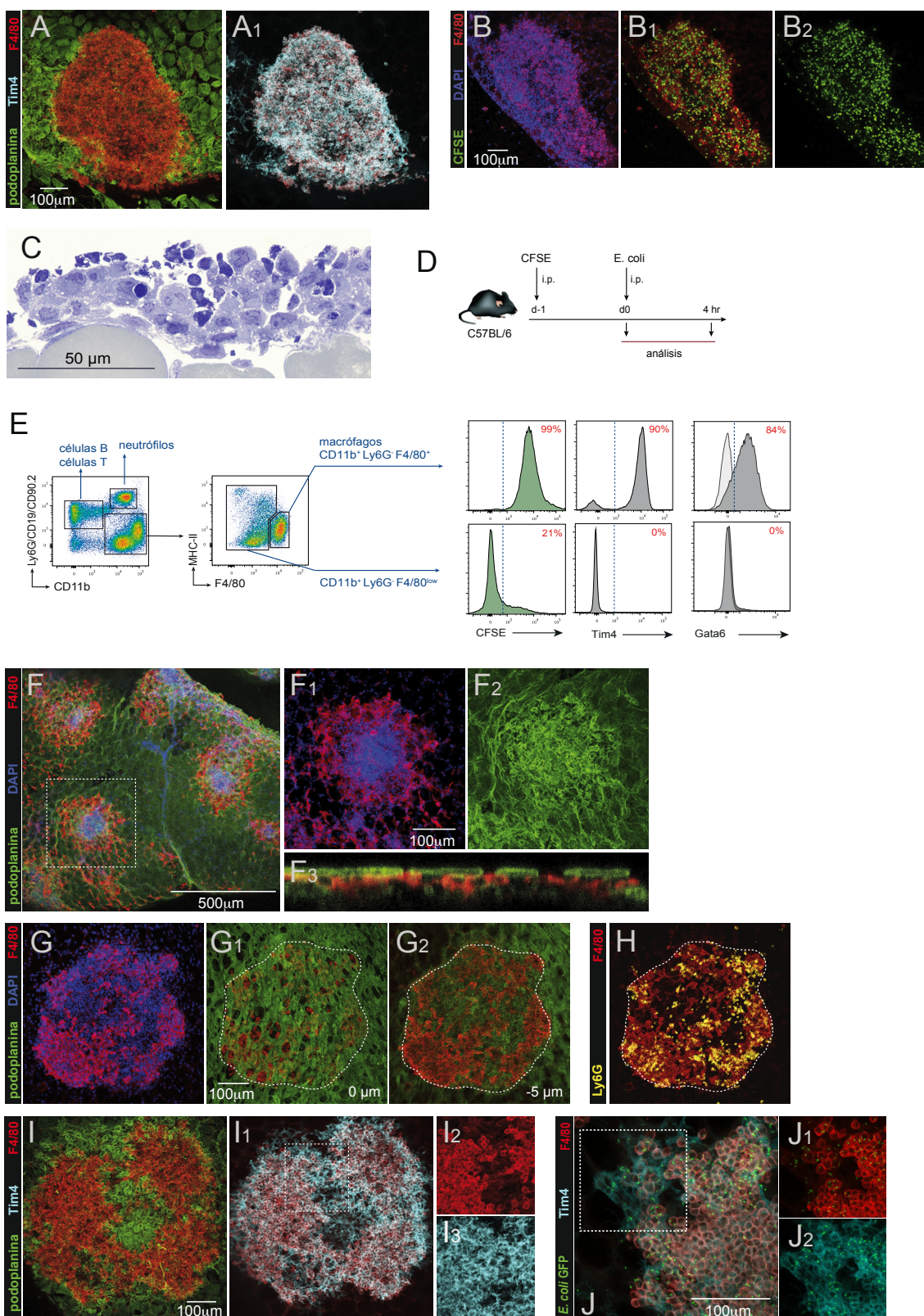


Figura 10. Caracterización de los macrófagos el omento presentes 4 horas p.i.

(A) Análisis de la formación de agregados de macrófagos (Tim4⁺ F4/80⁺) sobre la superficie del mesotelio (podoplanina⁺) que cubre el omento 4 horas tras la infección i.p. con *E. coli*, mediante WMI y microscopía confocal. (B) Análisis de la presencia de LPMs transferidos i.p. (CFSE⁺) en los milky spots del omento 4 horas tras la inoculación i.p. de la bacteria. (C) Corte semifino de omento de 800 nm de espesor teñido mediante azul de toluidina que muestra la presencia de agregados sobre el mesotelio del omento. (D) Protocolo de marcaje *in vivo* de las células presentes en la cavidad peritoneal con la sonda fluorescente CFSE 24 horas antes de la inoculación de *E. coli*. Se realizó el análisis del lavado peritoneal 24 horas tras la inoculación de la sonda, y 4 horas p.i. con *E. coli*. (E) Análisis de la señal de CFSE y de la expresión de Tim4 y Gata6 en las poblaciones CD11b⁺ F4/80^{high} y CD11b⁺ F4/80^{low} presentes en el omento, tras 4 horas p.i. con *E. coli*. (F) Formación de agregados a las 4 horas p.i. en zonas de milky spots donde los macrófagos (F4/80⁺) se encuentran

(continuación de página anterior)

localizados por debajo de la membrana mesotelial (podoplanina⁺). (F₃) Proyección ortogonal de (F). Análisis llevado a cabo mediante WMI y microscopía confocal. (G) Análisis de la localización de los macrófagos (F4/80⁺) tanto (G₁) en el plano de la superficie mesotelial (podoplanina⁺) como (G₂) 5 mm por debajo. (H) Presencia de neutrófilos Ly6G⁺ en los agregados de LPMs (F4/80⁺) en un *milky spot* del omento 4 horas tras la inoculación i.p. de la bacteria. Análisis llevado a cabo mediante WMI y microscopía confocal. (I) Caracterización de las diferentes subpoblaciones de macrófagos en los *milky spots* del omento 4 horas tras la inoculación i.p. de la bacteria mediante WMI y microscopía confocal. (J) Análisis de la presencia y localización de bacteria en los *milky spots* del omento 2 horas tras la inoculación de *E. coli* -GFP. Análisis llevado a cabo mediante WMI y microscopía confocal. Datos similares fueron obtenidos al menos por en 3 experimentos independientes.

llevados a cabo mediante citometría de flujo tras 4 horas p.i. mostraron la presencia de una población de macrófagos F4/80⁺ CFSE⁺ que no se detectaba en el omento en condiciones de reposo y que, a diferencia del resto de células presentes en el omento, se había marcado con la sonda fluorescente (Figura 10E). Así, estos datos demostraron que la mayor parte de los macrófagos F4/80⁺ detectados en los agregados formados en el omento eran LPMs, que migraban al omento durante la infección bacteriana.

Es interesante mencionar que estos acúmulos de macrófagos formados sobre la superficie del mesotelio (Figura 10C) fueron detectados principalmente en las zonas de omento carentes de *milky spots*. Los *milky spots* del omento son unas estructuras inmunes que se localizan bajo la membrana mesotelial y están formadas principalmente por células B, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, células NKT, monocitos y macrófagos. A diferencia de los agregados observados en zonas carentes de *milky spots*, donde los LPMs se

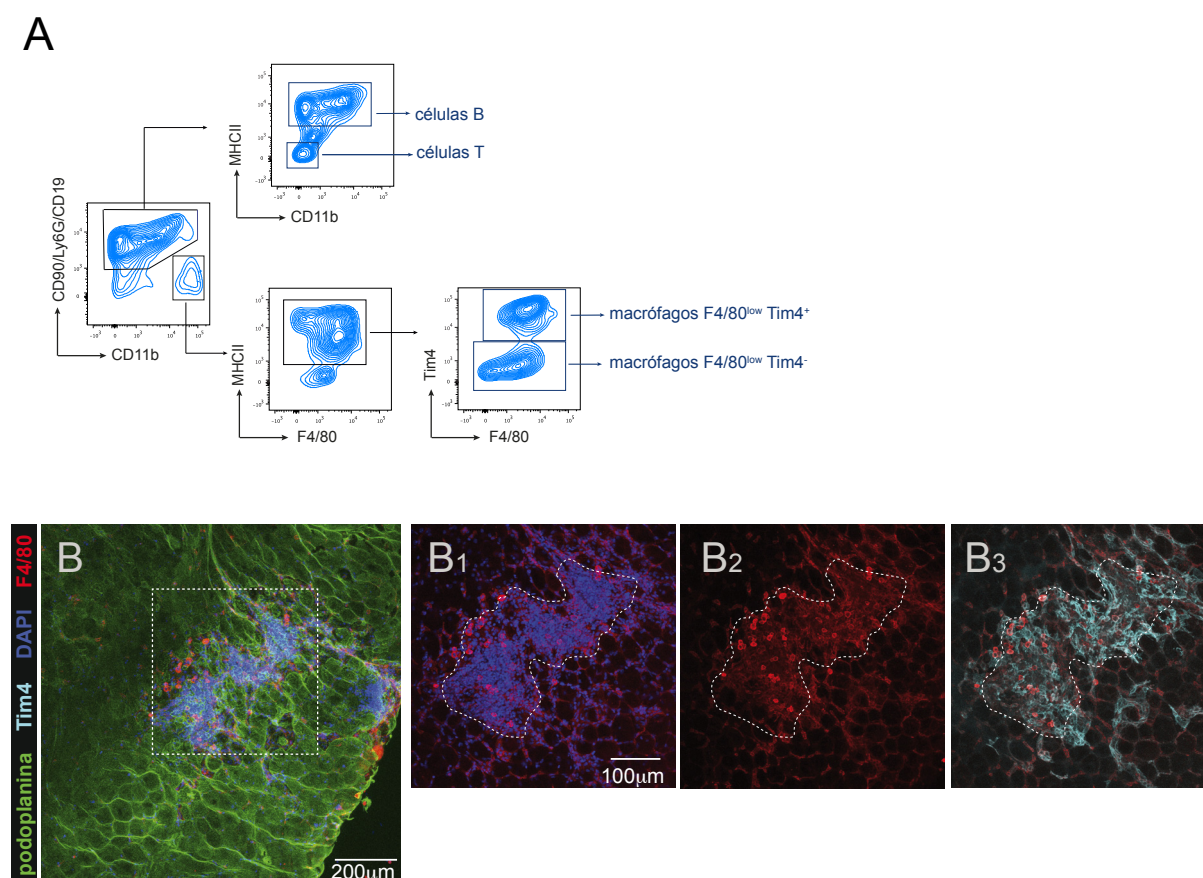


Figura 11. Caracterización de las poblaciones de macrófagos presentes en el omento en condiciones de reposo.

(A) Análisis fenotípico de las principales poblaciones hematopoyéticas que se encuentran en el omento en condiciones de reposo mediante citometría de flujo. (B) Caracterización de las diferentes subpoblaciones de macrófagos F4/80^{low} Tim4⁺ y F4/80^{low} Tim4⁻ presentes en los *milky spots* del omento en condiciones de reposo mediante WMI y microscopía confocal. Datos similares fueron obtenidos al menos por en 3 experimentos independientes.

localizaban por encima del mesotelio, en estas estructuras (Figura 10F-F2), los LPMs se situaban por debajo del mesotelio peritoneal, barrera que presenta importantes discontinuidades en estas localizaciones, tal y como mostraron las imágenes ortogonales (Figura 10F3) así como los análisis obtenidos a diferentes alturas a lo largo del eje Z (Figura 10G-G2). En los agregados asociados a *milky spots*, la mayor parte de las células $F_4/80^+$ detectadas expresaban Tim_4 , que se corresponderían a LPMs; así como también se detectó la presencia de una población de macrófagos que expresaba Tim_4^+ pero un menor nivel reducido de $F_4/80$ (Figura 10I-I3). Estos datos sugerían la coexistencia, durante la infección bacteriana de dos poblaciones de macrófagos en los *milky spots* del omento.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, el estudio llevado cabo por Buscher y colaboradores muestra que, durante la fase aguda de una infección polimicrobiana en la cavidad peritoneal, se produce un rápido reclutamiento al omento de neutrófilos, los cuales se extravasan desde el torrente sanguíneo a través de las vénulas del endotelio alto presentes en los *milky spots* (Buscher, K. et al.). De acuerdo con estos datos, los análisis de omento realizados mediante microscopía confocal a las 4 horas p.i., indicaron la presencia de neutrófilos asociados a los agregados de macrófagos presentes en el omento (Figura 10H).

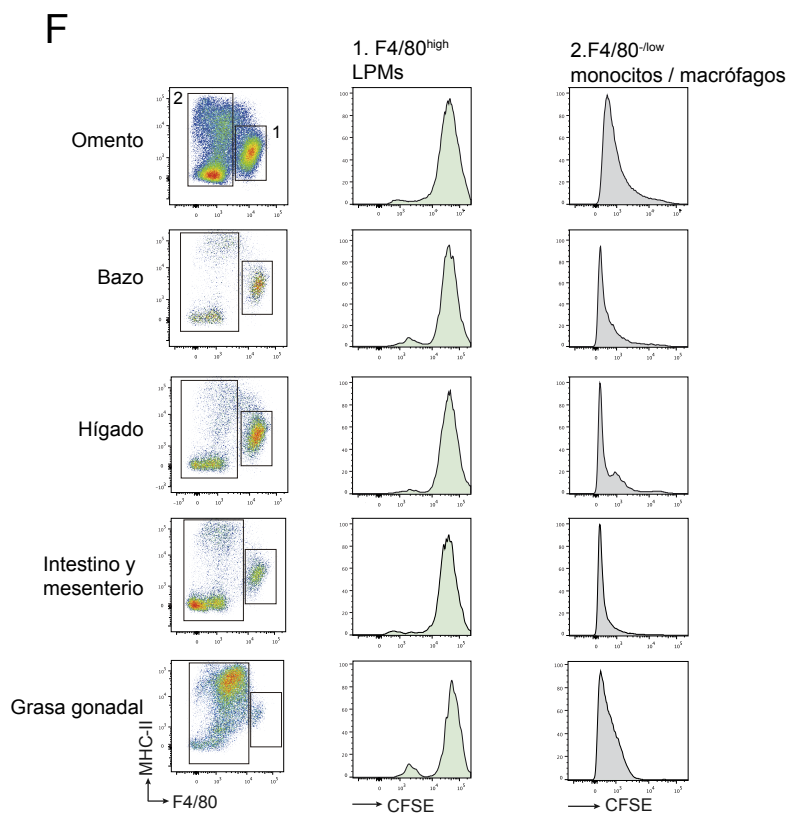
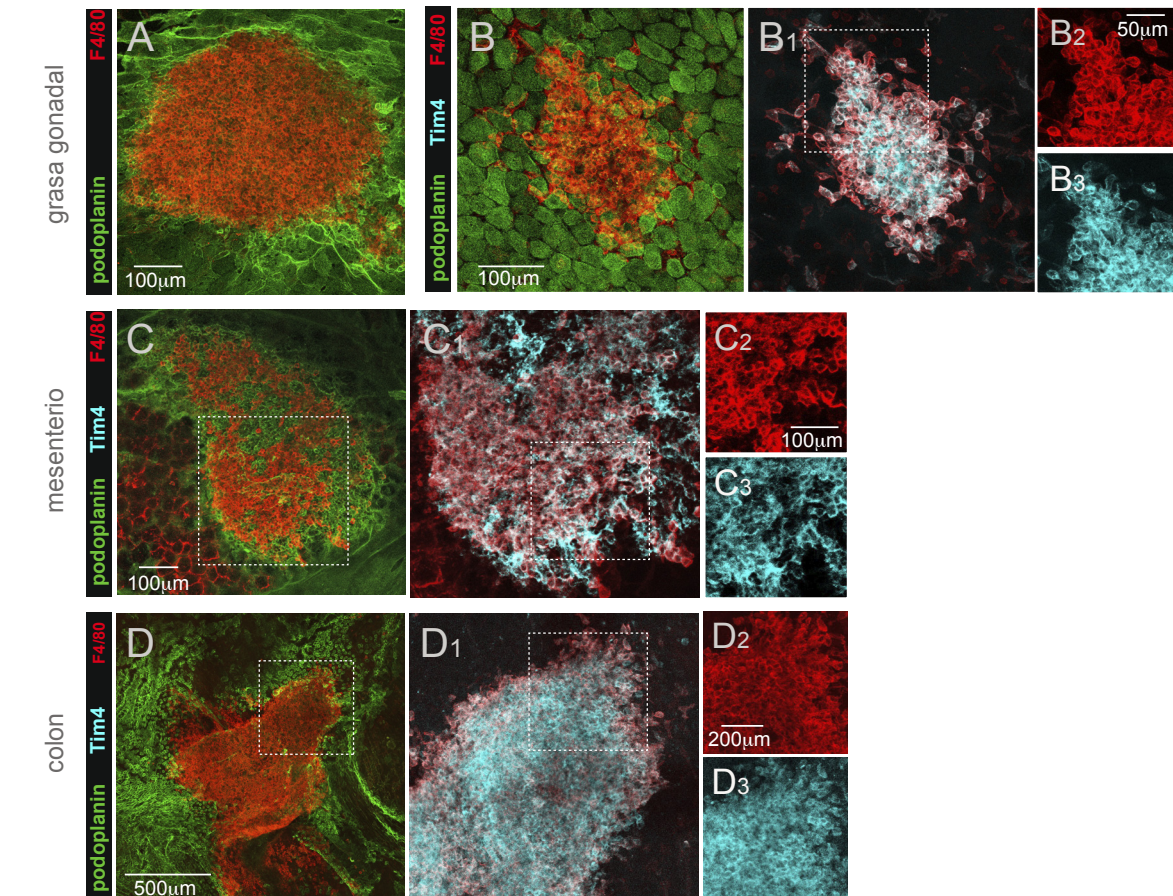
Por otra parte, es importante mencionar que varios estudios han propuesto que las discontinuidades en el mesotelio que cubre los *milky spots* del omento, ocasionan que estas estructuras inmunes queden expuestas a los patógenos presentes en el peritoneo. Por ello, decidimos valorar si tras la infección intraperitoneal con *E. coli*-GFP,

las bacterias eran también detectables en los *milky spots* del omento. A diferencia de lo observado en los acúmulos de macrófagos formados sobre la pared peritoneal, en los cuales la bacteria estaba únicamente confinada a los LPMs, nuestros resultados mostraron que, en los *milky spots* del omento, la bacteria fue internalizada tanto por los LPMs ($F_4/80^+ Tim_4^+$) como por los macrófagos $F_4/80^{low} Tim_4^+$ (Figura 10J-J2) que habíamos descrito previamente (Figura 10I-I3).

Con el objetivo de abordar si esta población de macrófagos $F_4/80^{low} Tim_4^+$ se encontraba en el omento en condiciones de reposo, analizamos las células presentes en el omento procedentes de ratones no infectados mediante citometría de flujo. Estos análisis mostraron que la mayor parte de los macrófagos detectados expresaban un bajo nivel de $F_4/80$ y podían subdividirse en dos poblaciones en función de la expresión de Tim_4 (Figura 11A). En línea con esta observación, los análisis mediante WMI y microscopía confocal demostraron que, en ratones no infectados, la mayor parte de los macrófagos asociados a *milky spots* eran $F_4/80^{low} Tim_4^+$, mientras que localizados fuera del *milky spot* eran $F_4/80^{low} Tim_4^-$; dos poblaciones que probablemente corresponderían con las subpoblaciones Tim_4^+ y Tim_4^- definidas mediante citometría de flujo. Asimismo, en condiciones de reposo se detectó un número minoritario de macrófagos $Tim_4^+ F_4/80^+$ en los *milky spots*, que probablemente corresponderían a LPMs que hubieran migrado al omento en condiciones de reposo (Figura 11B-B3). Estas observaciones sugieren que las células $F_4/80^{low} Tim_4^+$ detectadas en los agregados formados en los *milky spots* del omento a las 4 horas p.i., corresponden con las células $F_4/80^{low} Tim_4^+$ detectadas en condiciones de reposo, la principal población de macrófagos residentes de los *milky spots* en condiciones de reposo.

Figura 12. Los agregados de macrófagos se forman sobre la superficie mesotelial de los órganos abdominales. (página siguiente)

Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la formación de agregados de LPMs ($F_4/80^+ Tim_4^+$) en (A, B) grasa gonadal, (C) mesenterio y (D) colon 4 horas tras la infección i.p. con *E. coli*. (E) Protocolo de administración i.p. de la sonda fluorescente CFSE, con el fin de trazar la población de LPMs, 24 horas antes de la infección con *E. coli*. Los análisis de los distintos órganos peritoneales se realizaron 4 horas tras la infección. (F) Caracterización por citometría de flujo de la presencia de LPMs ($F_4/80^{high} CFSE^+$) en la superficie del omento, bazo, hígado, intestino-mesenterio y grasa gonadal 4 horas p.i., siguiendo el protocolo descrito en (E). La suspensiones celulares analizadas se obtuvieron tras la incubación de dichos órganos en presencia de una solución enzimática, tal y como está descrito en el apartado Material y Métodos. Datos similares fueron obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.



El fenómeno de MDR provocado por la infección bacteriana responde a la formación de agregados de LPMs en diversos órganos de la cavidad peritoneal

Tras caracterizar la formación de agregados de LPMs en el omento, pasamos a estudiar si este fenómeno también ocurría en otros órganos que contuvieran FALCS (*fat-associated lymphoid clusters*), agregados leucocitarios asociados a tejido adiposo que participan en la respuesta inmune peritoneal (Jackson-Jones et al., 2016). Con este objetivo, analizamos mediante microscopía confocal muestras de mesenterio y la grasa gonadal, órganos que, junto con el omento, contienen el mayor número de FALCS en la cavidad peritoneal (Jackson-Jones et al., 2016). A las 4 horas post infección detectamos agregados de macrófagos F4/80⁺ Tim4⁺ en la grasa gonadal (Figura 12A-12B) y el mesenterio (Figura 12C). Estos agregados eran comparables a los encontrados en el omento, puesto que encontramos tanto acúmulos asociados a los FALCS como agregados de macrófagos sobre la superficie estos órganos. Cabe mencionar que también se observaron agregados de macrófagos F4/80⁺ Tim4⁺ sobre el mesotelio que tapiza el colon (Figura 12D), por lo que decidimos evaluar, mediante citometría de flujo, si los LPMs son reclutados a otros órganos localizados en la cavidad peritoneal tras la infección con *E. coli*. Para ello, se administró la sonda CFSE con el objetivo de marcar fluorescentemente la población de LPMs presentes en la cavidad peritoneal 24 horas antes del inicio del proceso infeccioso (Figura 12E). A las 4 horas p.i., los órganos abdominales fueron extraídos e incubados con una solución enzimática con el fin de recuperar los LPMs adheridos a la superficie del mesotelio que los tapiza. El resultado de estos experimentos mostró que los LPMs (CFSE⁺ F4/80⁺ MHC-II⁺) se adherían al mesotelio visceral que recubre el omento, el bazo, el hígado, la grasa gonadal y el paquete intestinal durante el curso de la infección bacteriana (Figura 12F).

Por tanto, durante las primeras horas tras la infección ip. con *E. coli*, los LPMs desempeñan un papel esencial en el control de la infección, proceso

que es concomitante con su adhesión al mesotelio que recubre la pared peritoneal, formando grandes agregados multicelulares. Adicionalmente, los LPMs también migran al omento y a órganos peritoneales, como la grasa gonadal y el mesenterio, donde forman agregados de macrófagos asociados a los FALCS. Estos procesos previenen que los LPMs sean recuperables al realizar un lavado peritoneal, proporcionando con ello una explicación al fenómeno de MDR en nuestro modelo experimental.

Análisis del fenómeno de MDR y la consecutiva formación de agregados de LPMs en otros modelos de sepsis intraperitoneal

Con el objetivo de extender los resultados obtenidos a otros modelos experimentales de sepsis intraabdominal, se llevaron a cabo experimentos utilizando el modelo de FCT (*fecal content transfer*), en el que la sepsis peritoneal se induce tras inocular parte de contenido fecal presente en el ciego, que contiene numerosas especies bacterianas, junto con virus y hongos. Los análisis del lavado peritoneal llevados a cabo mediante citometría de flujo mostraron que la población de LPMs sufrió una significativa reducción en número durante las primeras 24 horas p.i, fenómeno que fue progresivamente revirtiéndose hasta obtener a día 6 p.i. un número de LPMs próximo al encontrado en condiciones de reposo (Figura 13A). Paralelamente a este fenómeno de MDR, observamos un reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal, semejante al descrito en el modelo de infección con *E. coli* (Figura 13B). Asimismo, 4 horas después de la infección, se detectaron agregados de macrófagos F4/80⁺ Tim4⁺, tanto en la pared peritoneal como en el omento, comparables a aquellos observados durante la infección intraperitoneal con *E. coli*. (Figura 13C-13D).

En conclusión, estos datos indican que la desaparición de la población de LPMs durante el MDR y su consiguiente adhesión al mesotelio no está restringida a un modelo de infección bacteriana determinado.

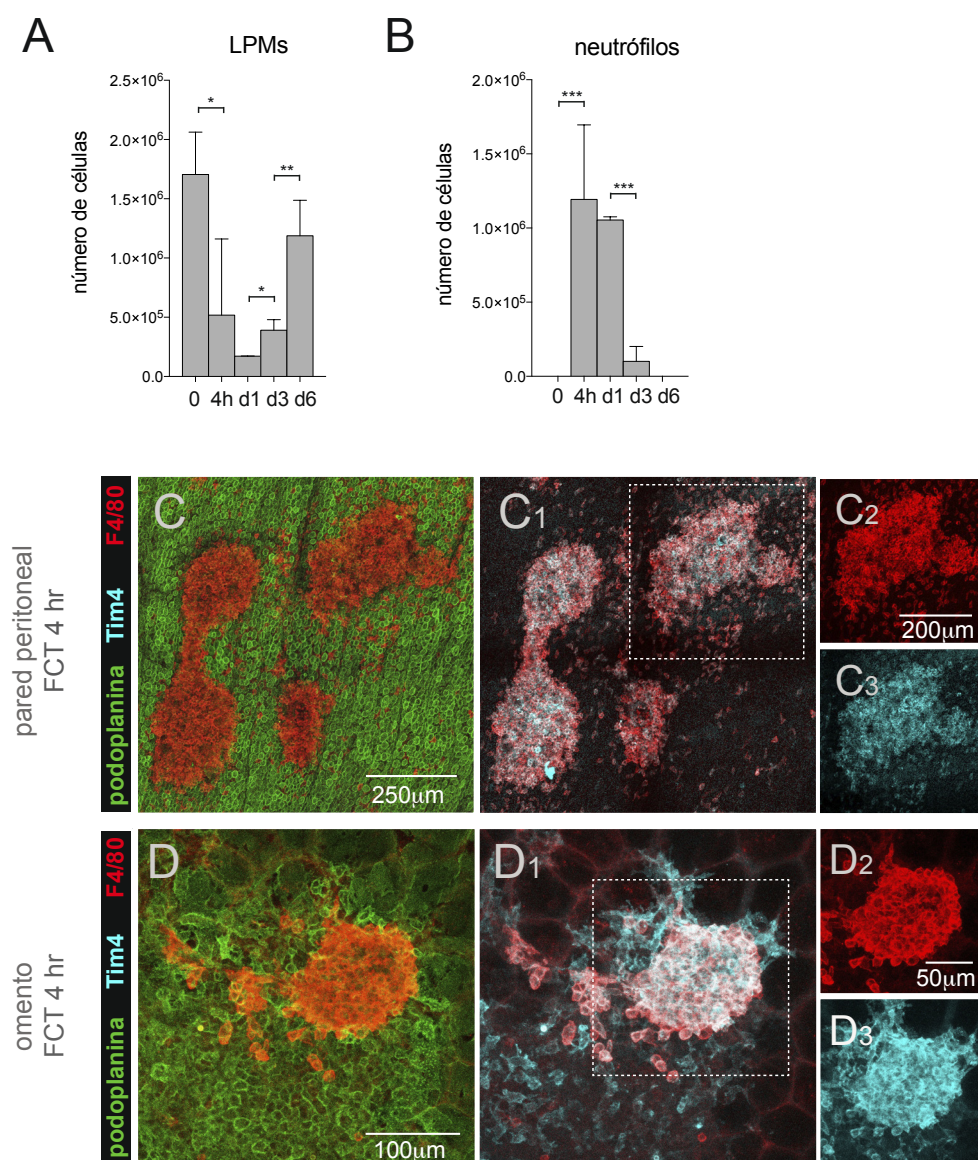


Figura 13. Análisis de la formación de agregados de macrófagos en la superficie mesotelial en un modelo de sepsis polimicrobiana peritoneal.

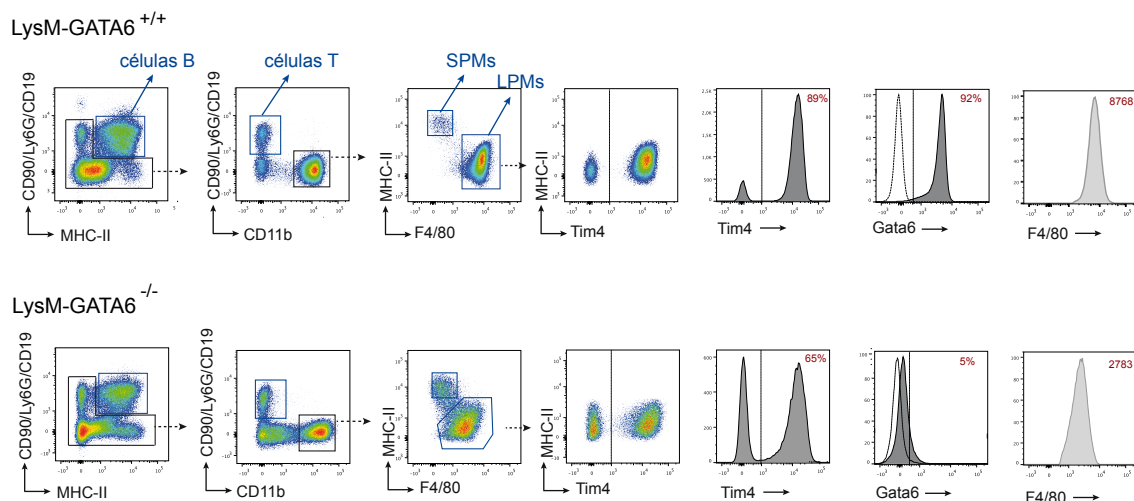
Número absoluto de (A) LPMs y (B) neutrófilos detectados en el lavado peritoneal a los tiempos indicados durante el proceso inflamatorio causado tras la administración i.p. de un extracto del contenido fecal (FC). (C y D) Formación de agregados de LPMs ($F4/80^+ Tim4^+$) sobre la pared peritoneal y el omento 4 horas tras la administración i.p. de FC. Análisis llevado a cabo mediante WMI y microscopia confocal. Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

La desestabilización del mesotelio durante la infección bacteriana depende de la presencia de LPMs en la cavidad peritoneal

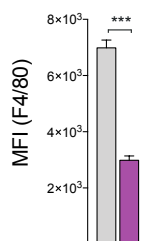
Los resultados obtenidos hasta el momento han puesto de manifiesto que los LPMs participan en el aclaramiento bacteriano que tiene lugar en la primera fase del proceso infeccioso, lo que ocurre de manera concomitante con su adhesión al mesotelio que cubre la cavidad peritoneal. Con el objetivo

de evaluar el impacto de la ausencia de los LPMs en el curso de la infección bacteriana, se utilizaron ratones $LysM-Gata6^{-/-}$ (Okabe and Medzhitov, 2014) en los cuales las células que expresan lisozima M, principalmente células del linaje mieloide, carecen del factor de transcripción Gata6, fundamental para la identidad y función de los macrófagos peritoneales residentes (LPMs). En primer lugar, se analizó mediante citometría de flujo el lavado peritoneal de ratones $LysM-Gata6^{-/-}$ en condiciones de reposo

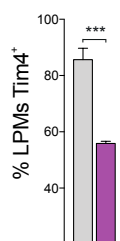
A



B



C



D

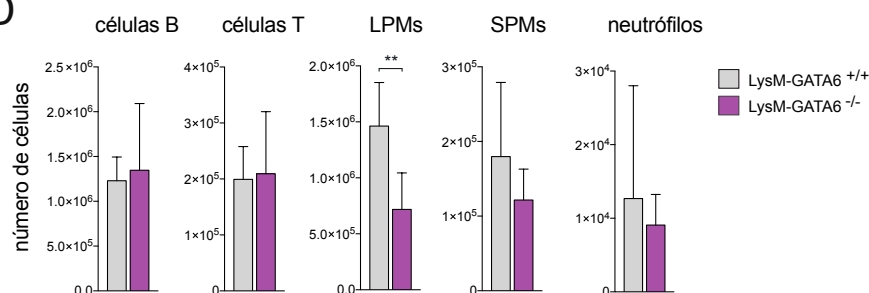


Figura 14. Análisis de las células presentes en el lavado peritoneal de ratones *LysM-Gata6*^{-/-} en condiciones de reposo.

(A) Análisis fenotípico mediante citometría de flujo de las principales poblaciones hematopoyéticas presentes en el lavado peritoneal de ratones *LysM-Gata6*^{+/+} y *LysM-Gata6*^{-/-} en condiciones de reposo. (B) Cuantificación de la expresión media de F4/80 en los LPMs de ratones *LysM-Gata6*^{+/+} y *LysM-Gata6*^{-/-} en condiciones de reposo. (C) Cuantificación del porcentaje de LPMs Tim4⁺ dentro de la población de LPMs de ratones *LysM-Gata6*^{+/+} y *LysM-Gata6*^{-/-} en condiciones de reposo. (D) Número absoluto de células B, células T, LPMs, SPMs y neutrófilos presentes en el lavado peritoneal de ratones *LysM-Gata6*^{+/+} y *LysM-Gata6*^{-/-} cuantificado mediante citometría de flujo. Datos representados como media ± SD de 5 ratones por condición. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes

(Figura 14A). Los resultados obtenidos mostraron una reducción significativa, de más de un 50%, en el número de LPMs presentes en los ratones deficientes en Gata6 los cuales, de acuerdo con estudios previos, no expresaban Gata6, presentaban un nivel de expresión de F4/80 más bajo y una menor proporción de células Tim4⁺ que los LPMs presentes ratones control (Figura 14A-14D) (Gautier et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014). No se detectaron diferencias en el resto de las poblaciones presentes en el lavado peritoneal en condiciones de reposo.

Los análisis llevados a cabo mediante citometría de flujo tras la inoculación intraperitoneal de *E. coli*

mostraron que la población de LPMs presente en los ratones *LysM-Gata6*^{-/-}, no era recuperable al realizar el lavado peritoneal tan solo tras 60 minutos postinfección (Figura 15A). Dado que la desaparición de los LPMs en estos ratones ocurría de manera más rápida a lo observado en ratones control, nos planteamos si este fenómeno respondía a una adhesión más rápida al mesotelio peritoneal o a que la viabilidad de estas células estaba afectada por el proceso infeccioso.

Para abordar este problema, se analizaron muestras de lavado peritoneal citocentrifugadas a los 60 min p.i. Estos análisis indicaron que, en los ratones

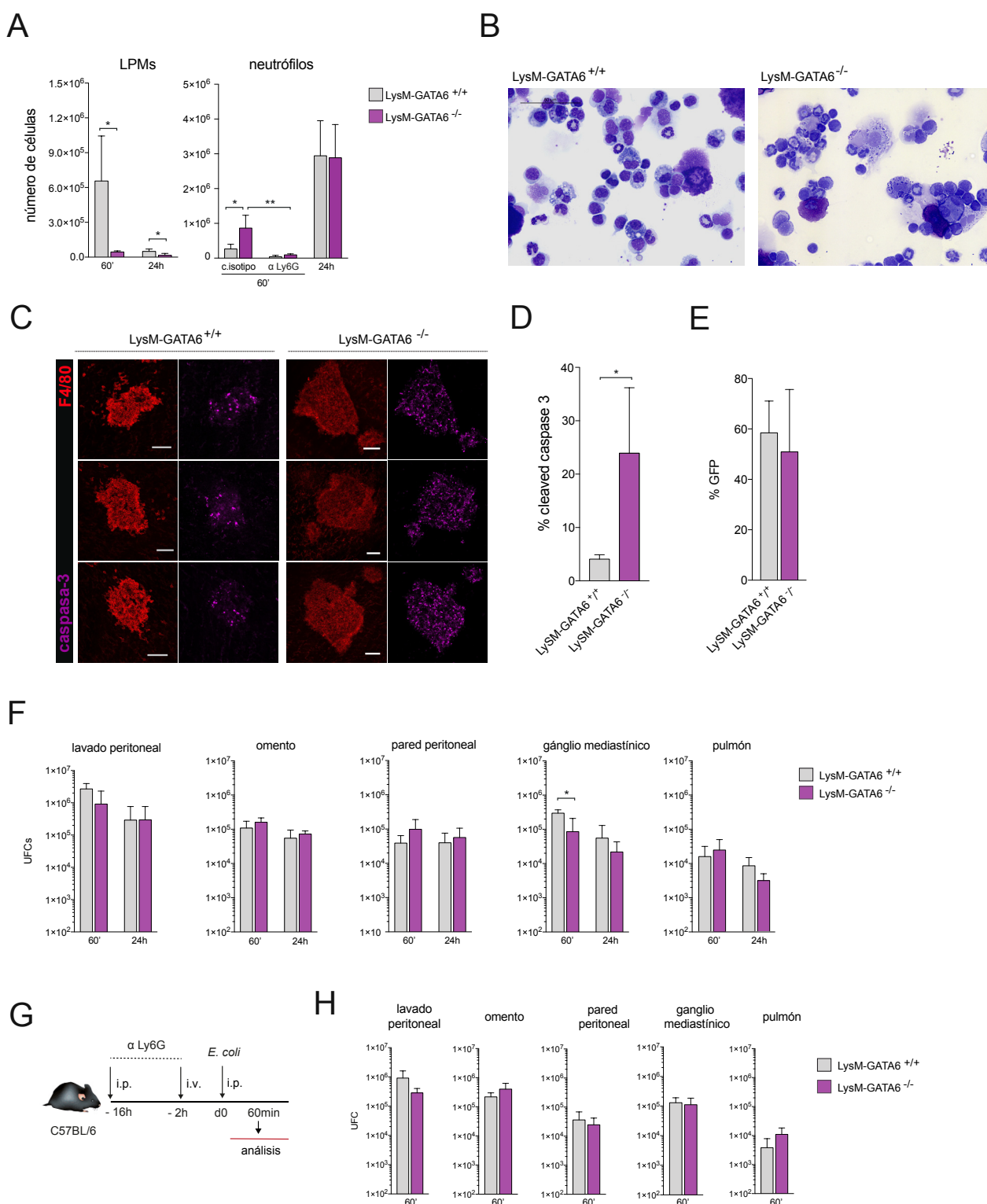


Figura 15. Los LPMs presentes en la cavidad peritoneal de ratones LySM Gata6^{-/-} combaten eficazmente la infección i.p. con *E.coli*

(A) Número absoluto de LPMs y neutrófilos presentes en el lavado peritoneal de ratones LysM-Gata6^{+/+} y LysM-Gata6^{-/-} a los tiempos indicados tras la infección bacteriana. (B) Muestras citocentrifugadas de lavado peritoneal procedentes de ratones LysM-Gata6^{+/+} y LysM-Gata6^{-/-} obtenidas 60 minutos p.i. y teñidas con azul de toluidina. (C) Análisis mediante WMI y microscopía confocal y (D) cuantificación de la expresión de caspasa-3 activa (*cleaved-caspase 3*) en agregados de LPMs presentes en las paredes peritoneales de ratones LysM-Gata6^{+/+} y LysM-Gata6^{-/-}, 4 horas tras la infección con *E. coli*. (E) Análisis mediante citometría de flujo del porcentaje de LPMs GFP⁺ dentro de la población de LPMs presentes en el lavado peritoneal de ratones LysM-Gata6^{+/+} y LysM-Gata6^{-/-}, 30 minutos tras la inoculación i.p. de *E. coli*-GFP. (F) Carga bacteriana presente en el lavado peritoneal, omento, pared peritoneal, ganglio mediastínico y pulmón de ratones LysM-Gata6^{+/+} y LysM-Gata6^{-/-} 60 minutos y 24 horas tras la infección con *E. coli*. (G) Protocolo de administración del anticuerpo monoclonal anti-Ly6G (1A8) o su control de isotipo, utilizado para el bloqueo del reclutamiento de

(continuación de la página anterior, relativo a Figura 15) neutrófilos a la cavidad peritoneal durante la infección con *E. coli*. El número absoluto de neutrófilos se muestra en (A). (H) Análisis de la carga bacteriana presente en los órganos indicados procedentes de ratones LysM-Gata6^{+/+} y LysM-Gata6^{-/-} 60 minutos tras la infección con *E. coli*, de acuerdo con el protocolo descrito en (G). Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

deficientes en Gata6, los LPMs recuperables en el lavado peritoneal habían internalizado un número elevado de bacterias en su citoplasma y presentaban características morfológicas que sugerían que su viabilidad estaba comprometida (Figura 15B). En línea con estos datos, los análisis llevados a cabo mediante microscopía confocal mostraron que, al igual que se observó en ratones control, los LPMs en el modelo LysM-Gata6^{-/-} formaban agregados en la pared peritoneal. Éstos, sin embargo, presentaban una forma más irregular con un mayor nivel de expresión del marcador de apoptosis caspasa-3 activa (Figura 15C-15D). En siguiente lugar valoramos si los LPMs de los ratones LysM-Gata6^{-/-}, a pesar de presentar una baja viabilidad, eran capaces de internalizar eficazmente *E. coli*. Para ello, se analizó el lavado peritoneal de ratones control y deficientes en Gata6, 30 minutos tras la infección intraperitoneal con *E. coli-GFP*. Nuestros resultados revelaron que los LPMs presentes en los ratones LysM-Gata6^{-/-} internalizaban la bacteria a niveles comparables a lo observado en los LPMs procedentes de ratones control (Figura 15E).

Teniendo en cuenta estos datos, analizamos la carga presente en la cavidad peritoneal (lavado peritoneal, omento y pared peritoneal) así como en órganos extraperitoneales (ganglios mediastínicos y pulmón) 60' y 24h tras la administración i.p. de *E. coli*. Estos ensayos no mostraron diferencias en la carga bacteriana detectada entre los ratones control y los ratones LysM-Gata6^{-/-} en ninguno de los dos tiempos de análisis (Figura 15F). Puesto que a los 60 minutos p.i. se observó un incremento significativo en la población de neutrófilos reclutados a la cavidad peritoneal en ratones deficientes en Gata6 (Figura 15A), valoramos si estas células podrían compensar la deficiencia numérica y la baja viabilidad de los LPMs en este modelo. Para ello, diseñamos una estrategia experimental dirigida a eliminar la población de

neutrófilos basada en el uso de un anticuerpo monoclonal citotóxico anti-Ly6G. Así, administramos dos dosis de 100 μ g del anticuerpo 1A8, 16 y 2 horas antes de la inducción de la infección y, 60 minutos p.i. se cuantificó la carga bacteriana presente tanto en órganos intra como extraperitoneales (Figura 15G). Los resultados obtenidos de estos análisis mostraron una reducción significativa en los neutrófilos reclutados al peritoneo (Figura 15H) que sin embargo no se traducía en un peor aclaramiento de la infección bacteriana en los ratones LysM-Gata6^{-/-} (Figura 15H). Estos datos confirmaron que los ratones LysM-Gata6^{-/-} eran capaces de contener la infección causada tras inocular una dosis de 1×10^7 UFCs de *E. coli* a pesar de las deficiencias descritas en la población de LPMs en estos ratones.

Dado que el modelo LysM-Gata6^{-/-} no nos permitió abordar la relevancia de los LPMs en el control de la infección, utilizamos ratones en los que la población de LPMs fue eliminada mediante la administración de liposomas cargados con clodronato, estrategia ampliamente utilizada para la eliminación de diferentes poblaciones de macrófagos en diferentes condiciones experimentales (Wang and Kubes, 2016). El tratamiento de clodronato encapsulado en liposomas provocó la eliminación eficaz de la población de LPMs durante al menos 12 días (Figura 16A-16C). Es importante mencionar que la administración de liposomas con clodronato indujo el reclutamiento temprano de células inflamatorias, que, sin embargo, no fueron detectadas 12 días más tarde. Con el objetivo de evaluar si la ausencia de la población de LPMs en el inicio de la infección tenía repercusión en el control de la misma, se cuantificó la carga bacteriana a las 24 horas p.i. (Figura 16D). Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron un incremento significativo en la carga bacteriana presente en órganos intra y extraabdominales en ausencia de la población de

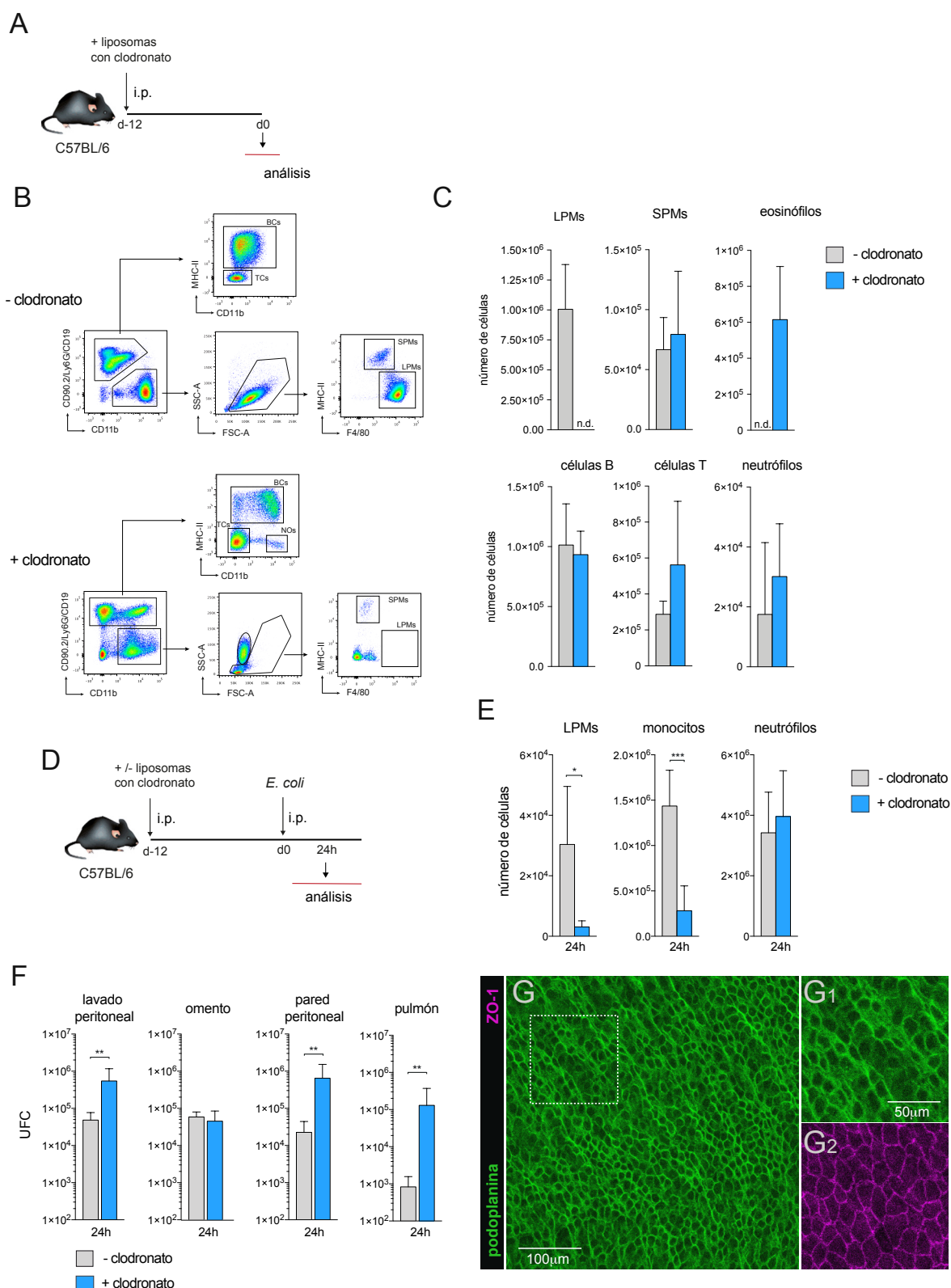


Figura 16. La eliminación de la población de LPMs dispara la carga bacteriana y previene tanto la formación de agregados multicelulares sobre el mesotelio como la desestabilización de la barrera mesotelial.

(A) Protocolo de administración i.p. de liposomas, con o sin clodronato, y análisis de las diferentes poblaciones hematopoyéticas del lavado peritoneal mediante citometría de flujo 12 días después. (B) Análisis mediante citometría de flujo, y (C) cuantificación, de las poblaciones hematopoyéticas presentes en el lavado peritoneal de ratones no infectados 12 días tras la administración de liposomas con o sin clodronato. (D) Protocolo de administración i.p. de liposomas, con o sin clodronato, 12 días antes de la inoculación i.p. de *E. coli*. El análisis del lavado peritoneal se realizó 24 horas p.i. (E) Número absoluto de LPMs, monocitos y neutrófilos presentes en el lavado peritoneal 24 horas tras la infección con *E. coli*, siguiendo el protocolo descrito en (D). (F) Cuantificación de la carga bacteriana detectada en lavado peritoneal, omento, pared peritoneal y pulmón de ratones inoculados con liposomas, con o sin clodronato, 24

(continuación de la página anterior, relativo a Figura 16) horas tras la inoculación de la bacteria, de acuerdo con el protocolo descrito en (D). (G) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la expresión de ZO-1 en el mesotelio de la pared peritoneal procedente de ratones inoculados con liposomas, con o sin clodronato, 24 horas tras la inoculación de la bacteria, de acuerdo con el protocolo descrito en (D). Datos representados como media \pm SD de 5 ratones por condición. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ prueba t de Student para muestras independientes. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

LPMs (Figura 16E-16F).

El tratamiento de liposomas con clodronato se correlacionó con la ausencia de agregados de macrófagos sobre la superficie del mesotelio peritoneal, tal y como mostraron los análisis de pared peritoneal realizados mediante WMI y microscopía confocal 24 horas p.i. Es interesante mencionar que el mesotelio peritoneal mostraba, a diferencia de lo observado en los ratones no tratados a este tiempo de análisis (Figura 8C), un aspecto pavimentoso, continuo y plano, semejante al observado en condiciones de reposo, tal y como reflejaba la expresión de podoplanina y ZO-1 (Figura 16G-G2). Estos datos indican en primer lugar que, a pesar de que los agregados observados en la pared son estructuras multicelulares, los LPMs son necesarios para su formación y, en segundo lugar, que la desestabilización inicial del mesotelio observada durante la infección con *E. coli* se produce por la formación de agregados de macrófagos sobre la superficie del mesotelio peritoneal.

ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS AGREGADOS DE MACRÓFAGOS SOBRE LA PARED PERITONEAL DURANTE LA FASE DE RESOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN BACTERIANA

En siguiente lugar, decidimos analizar la evolución de estas complejas estructuras a diferentes tiempos postinfección: a día 1, cuando la carga bacteriana detectada en el lavado peritoneal ya se había reducido hasta un 1% de la dosis inicial inoculada; a día 4, correspondiente al pico de la respuesta inflamatoria, caracterizado por el reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal; y a día 8, cuando la infección bacteriana estaba prácticamente resuelta tanto en la cavidad peritoneal como en los órganos periféricos analizados.

Los análisis de la pared peritoneal a día 1 p.i. mostraron que la cara luminal de la pared peritoneal estaba cubierta por grandes agregados de macrófagos que, tal y como observamos a las 4 horas p.i., expresaban Tim4 (Figura 17A-A3). Es interesante mencionar que a diferencia de lo observado en los análisis llevados a cabo a 4 horas p.i., fase en la que los LPMs formaban agregados definidos sobre el mesotelio peritoneal, a 1 día p.i., los LPMs que formaban estos agregados no estaban únicamente confinados a estas estructuras, sino que también estaban dispersos alrededor del agregado inicial (Figura 17A2). Como se ha demostrado anteriormente, la adhesión de los LPMs al mesotelio peritoneal desestabiliza la barrera mesotelial en una fase temprana de la infección. En línea con estas observaciones, los análisis de pared peritoneal llevados a cabo a día 1 p.i. mostraron que el mesotelio presente tanto por debajo de los agregados de macrófagos como adyacente a ellos estaba particularmente desorganizado (Figura 17A1). Es interesante mencionar que las proyecciones ortogonales de pared peritoneal obtenidas a este tiempo p.i. mostraron que los LPMs que rodeaban a los agregados de macrófagos, estaban intercalados -en el mismo plano- entre las células mesoteliales (Figura 17B), lo que sugería que la desorganización del mesotelio permitía la migración de los macrófagos a través de las discontinuidades existentes entre las células mesoteliales.

Tras 4 días p.i., los agregados de macrófagos encontrados en la pared peritoneal mostraban una organización mucho menos definida que la observada en fases más tempranas. (Figura 17C). El mesotelio presente bajo estos agregados de macrófagos estaba muy desorganizado y mostraba discontinuidades (Figura 17C1-C2), a diferencia de lo observado en zonas más alejadas de estas estructuras, donde el mesotelio volvía a mostrar el aspecto pavimentoso

y continuo característico de condiciones de reposo (Figura 17C3). Por otro lado, cabe destacar que alrededor de un 30% de los macrófagos que componían estos agregados tenían un fenotipo $F4/80^+ Tim4^+$ y, muy probablemente correspondían a LPMs, mientras que el resto de las células $F4/80^{+/int}$ presentes en los agregados no expresaban el marcador $Tim4$ (Figura 17 C4-C6). Los análisis de las proyecciones ortogonales obtenidas a este tiempo de la infección indicaron que, mientras que los LPMs estaban mayoritariamente sobre o intercalados entre las células mesoteliales (y solo algunos eran detectados en el estroma submesotelial), las células $F4/80^{+/int} Tim4^-$ estaban principalmente localizadas en el espacio submesotelial (Figura 17D-17E). Estos datos fueron confirmados con los análisis de secciones semifinas de pared peritoneal que revelaron que solo un pequeño número de macrófagos se encontraba sobre las células mesoteliales, mientras que el estroma submesotelial presentaba un importante infiltrado de células con una morfología característica de macrófagos y linfocitos (Figura 17 F-F1).

Es interesante mencionar que las células $F4/80^{+/int} Tim4^-$ no estaban únicamente localizadas en las zonas de agregados de LPMs, sino que se encontraron en zonas desprovistas de estas, tal y como mostraron los análisis obtenidos a diferentes alturas del eje Z (Figura 17G-G1).

La distribución de las células $F4/80^{+/int}$ a día 4 p.i. sobre el mesotelio peritoneal era muy irregular, por lo que a este tiempo la pared peritoneal tenía un aspecto parcheado, con agregados de macrófagos intercalados entre áreas de mesotelio libres de macrófagos (Figura 17G).

Nuestros datos reflejan que en una fase más temprana de la infección (4 horas -día 1 p.i.) existe una pronunciada desorganización del mesotelio peritoneal causada por la alteración en las uniones intercelulares que anclan a las células mesoteliales entre sí. De acuerdo con estos datos, en esta fase de la infección observamos zonas del mesotelio que expresaban el marcador de proliferación Ki67,

sugiriendo que, el mesotelio, tras haber sido dañado durante la infección, se encontraba en proceso de reparación (Figura 17 H-H1).

Como ha sido mencionado previamente, durante las primeras horas tras la inoculación bacteriana se produce un reclutamiento de monocitos inflamatorios a la cavidad peritoneal (Figura 2C). Los análisis llevados a cabo mediante citometría de flujo de las células presentes en el lavado peritoneal mostraron que, a día 4 p.i., existía una población de células que presentaban un fenotipo $CD11b^+ MHCII^+ Ly6C^{int} F4/80^{int} Tim4^-$ (Figura 18A), que no estaban presentes en los ratones no infectados (Figura 2A). Por ello, nos planteamos si estas células eran macrófagos inflamatorios derivados de monocitos que son reclutados a la cavidad peritoneal durante el inicio de la respuesta inflamatoria. Con este objetivo, se analizaron las células presentes en el lavado peritoneal de ratones $CCR2^{-/-}$ a día 4 p.i., en los que se observó una importante reducción en la población $F4/80^{int} Tim4^-$, lo que sugería que estas células correspondían a macrófagos derivados de monocitos (Figura 18A-18B). Con el fin de abordar si las células $F4/80^{int} Tim4^-$ observadas en las paredes a día 4 p.i. correspondían a los macrófagos inflamatorios derivados de monocitos previamente descritos, se analizaron las paredes peritoneales de ratones $CCR2^{-/-}$ mediante WMI y microscopía confocal. Los resultados obtenidos revelaron que, a día 4 p.i., la gran mayoría de los macrófagos observados en la pared presentaban un fenotipo $F4/80^+ Tim4^+$, mientras que solo una minoría eran $F4/80^{int} Tim4^-$ (Figura 18C-C3). Por tanto, estos datos apoyan que los macrófagos $F4/80^{int} Tim4^-$ observados a día 4 p.i. en los agregados de un ratón control, son macrófagos inflamatorios derivados de monocitos.

En conclusión, nuestros datos demuestran que en una fase temprana de la infección se forman agregados de LPMs discretos sobre la superficie de la pared peritoneal y, que a tiempos posteriores de la infección (día 4), los agregados de macrófagos están formados por grupos de agregados más dispersos, donde los LPMs son una población minoritaria,

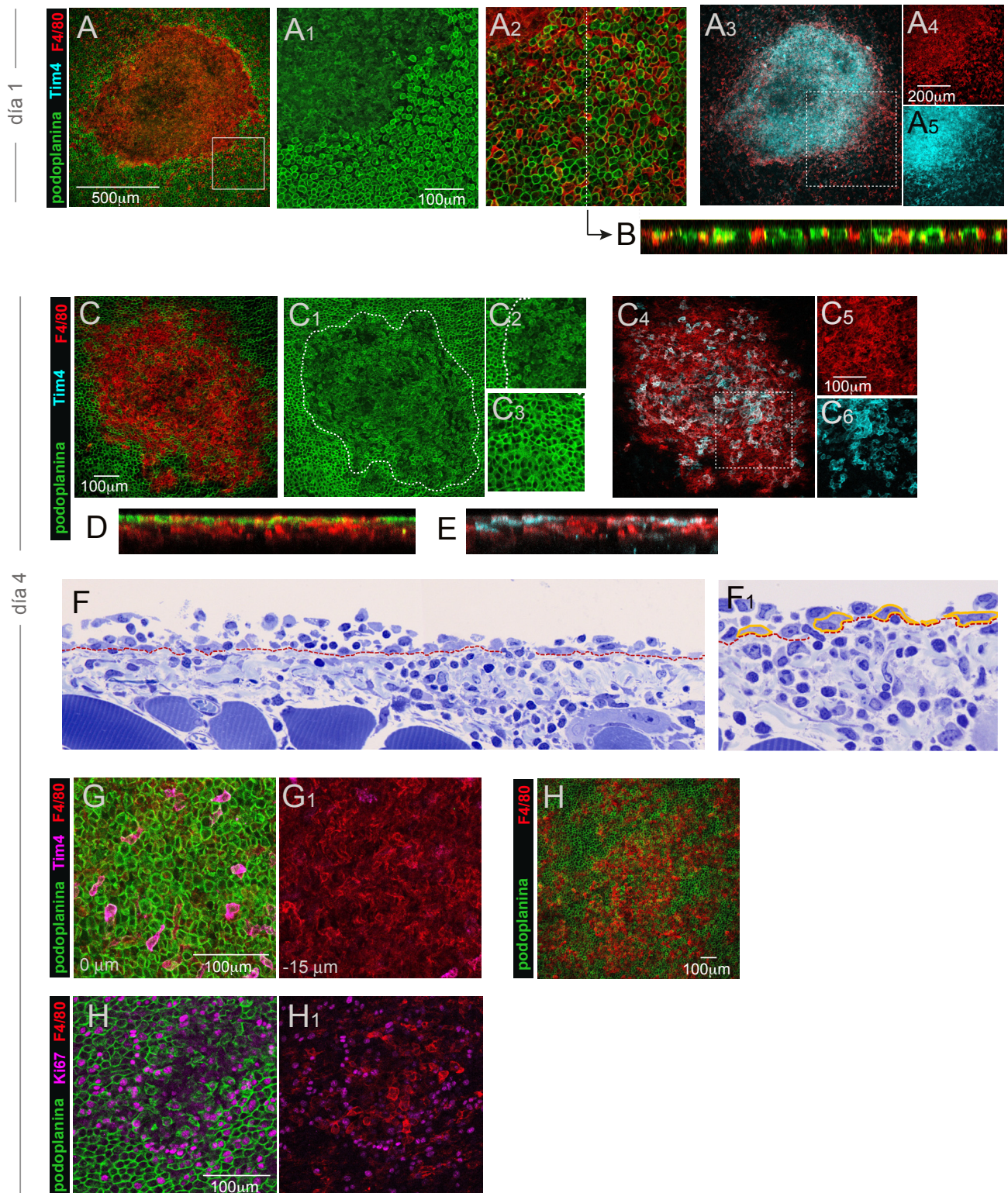


Figura 17. Evolución de los agregados de macrófagos en la pared peritoneal a diferentes tiempos tras la infección i.p. con *E.coli*.

(A) Caracterización mediante WMI y microscopía confocal de los agregados de LPMs F4/80⁺ Tim4⁺, así como de la organización mesotelial en base a la expresión de podoplanina, 1 día tras la infección i.p. con *E.coli*. (B) Proyección ortogonal obtenida en (A2). (C) Caracterización mediante WMI y microscopía confocal de los agregados de LPMs F4/80⁺ Tim4⁺ y macrófagos F4/80^{int} Tim4⁻, así como de la organización mesotelial en base a la expresión de podoplanina, 4 días tras la infección i.p. con *E.coli*. (D y E) Proyecciones ortogonal obtenidas en (C). (F) Corte semifino de 800 nm de espesor de pared peritoneal 4 días tras la infección i.p. con *E.coli* teñido con azul de toluidina, que muestra la presencia de macrófagos (línea amarilla) por encima del mesotelio (línea roja discontinua), así como una fuerte infiltración leucocitaria submesotelial. (F1) Magnificación del corte indicada en (F). (G) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la presencia de LPMs F4/80⁺ Tim4⁺ y macrófagos F4/80^{int} Tim4⁻ en diferentes planos del eje Z de la pared peritoneal. (H) Caracterización mediante WMI y microscopía confocal de la desorganización mesotelial (podoplanina⁺) a consecuencia

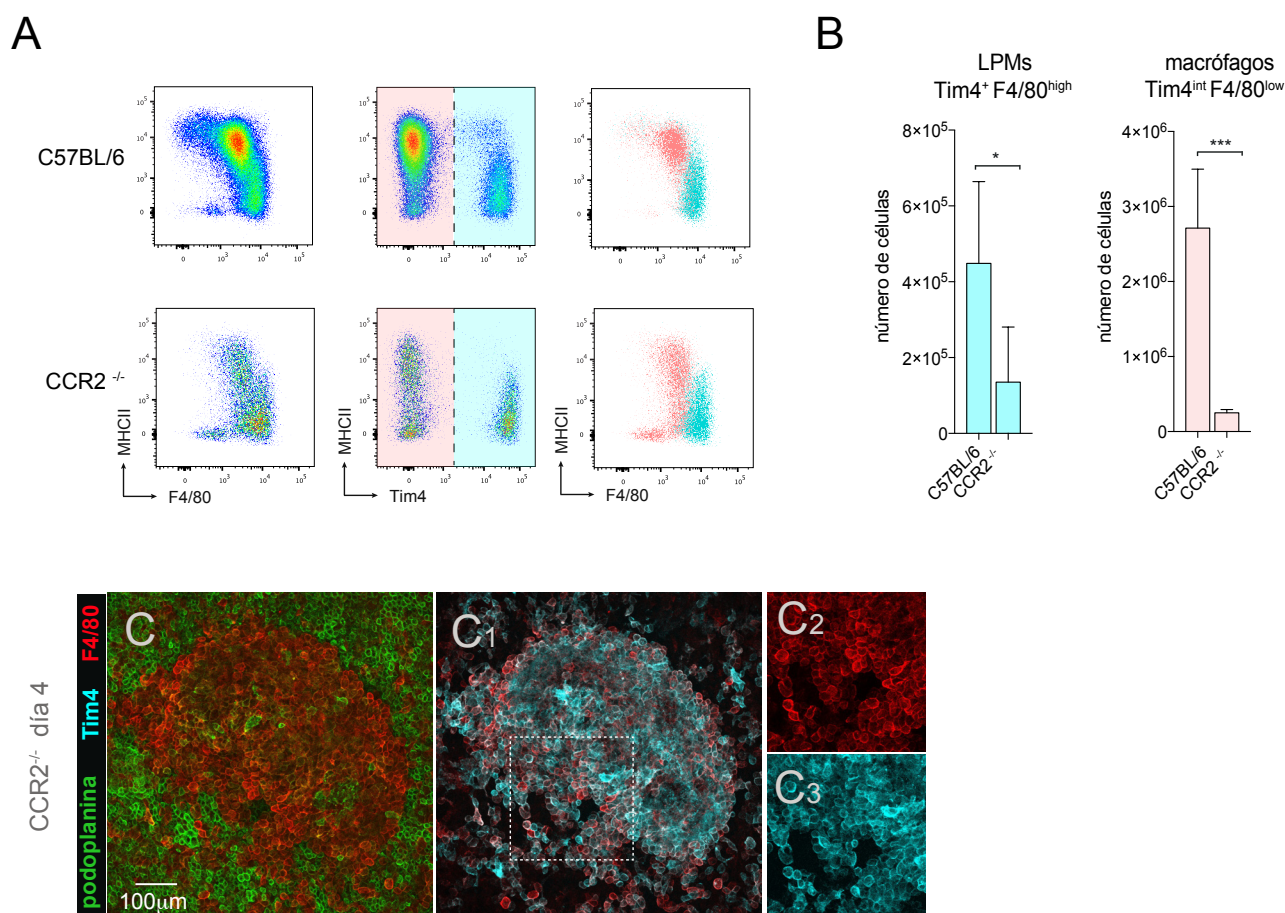


Figura 18. Análisis del reclutamiento de macrófagos inflamatorios a la cavidad peritoneal 4 días p.i. con *E.coli*.

(A) Análisis mediante citometría de flujo y (B) cuantificación de la población de LPMs (F4/80⁺ Tim4⁺) y de macrófagos inflamatorios F4/80^{int} Tim4⁻, dentro de las células CD11b⁺ presentes en el lavado peritoneal de ratones C57BL/6 y CCR2^{-/-}, 4 días tras la infección i.p. con *E.coli*. (C) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de agregados de macrófagos formados en la pared peritoneal de ratones CCR2^{-/-}, 4 días tras la infección i.p. con *E.coli*. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes

mientras que hay un predominio de macrófagos inflamatorios derivados de monocitos F4/80^{int} Tim4⁻. Éstos últimos no están restringidos a las zonas donde previamente había existido un agregado, sino que se detectaron grandes extensiones de pared peritoneal en las cuales se localizaban numerosos macrófagos F4/80^{int} Tim4⁻ debajo del mesotelio. Estos resultados reflejan que en esta fase del proceso infeccioso se produce un importante infiltrado de células inflamatorias que desestabiliza profundamente la organización de la membrana mesotelial.

En este contexto, decidimos analizar las paredes

peritoneales a un tiempo tardío p.i., día 8, cuando la infección estaba prácticamente resuelta, los LPMs eran recuperables en el lavado peritoneal y apenas se detectaron neutrófilos en la cavidad peritoneal. Los análisis de pared peritoneal mediante WMI y microscopía confocal mostraron que a día 8 p.i. aunque no se observaron agregados de macrófagos en la pared (Figura 19A), se detectaron zonas del mesotelio que parecían estar recuperadas tras haber sufrido un daño previo (Figura 19A3-A4), así como zonas de pared en las que las células mesoteliales presentaban alteraciones en el patrón de expresión de podoplanina, ZO-1 (uniones estrechas) y

(continuación de la página anterior, relativo a Figura 15) de la presencia de macrófagos F4/80⁺ en la pared peritoneal, 4 días tras la infección i.p. con *E.coli*. (I) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la expresión de Ki67 en las células mesoteliales (podoplanina⁺) de la pared peritoneal, 4 días tras infección i.p. con *E.coli*. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes.

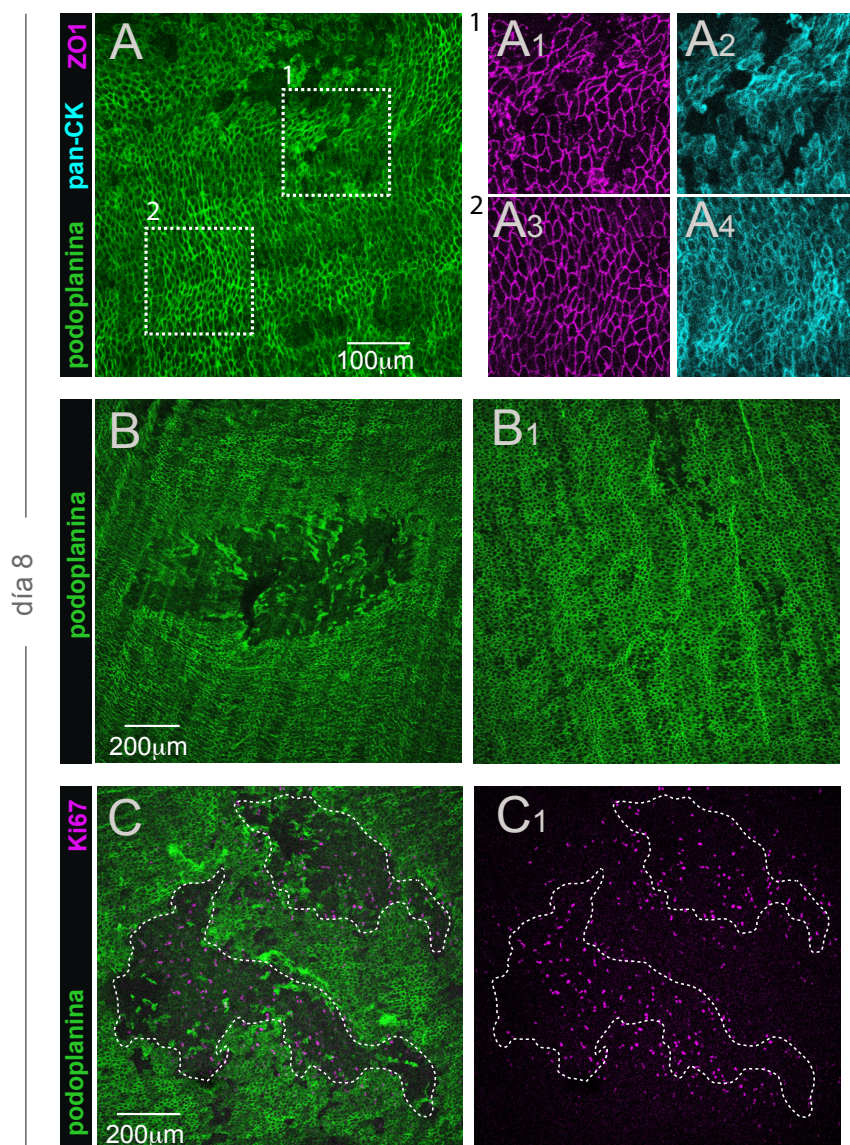


Figura 19. La barrera mesotelial permanece alterada en la fase de resolución del proceso infeccioso.

(A y B) Análisis mediante WMI y microscopía confocal de la integridad del mesotelio peritoneal en base a la expresión de podoplanina, ZO-1 y pan-citoqueratina, 8 días tras la infección i.p. con *E.coli*. (C) Análisis de la expresión de Ki67 en el mesotelio peritoneal 8 días tras la infección i.p. con *E.coli*, mediante WMI y microscopía confocal. Datos similares obtenidos en al menos 3 experimentos independientes

citoqueratina (filamento intermedio expresado por las células mesoteliales), reflejo del daño residual resultante del desarrollo de los agregados descritos anteriormente (Figura 19A1-A2). En línea con estos datos se observaron zonas donde el mesotelio estaba particularmente dañado (Figura 19B-B1), y en algunas de ellas las mesoteliales expresaban el marcador de proliferación Ki67, indicando que la proliferación de las células mesoteliales participaba en la reparación del mesotelio previamente dañado durante la infección (Figura 19C).

Por tanto, estos datos reflejan que la formación de agregados de LPMs, y la fuerte infiltración de macrófagos inflamatorios en el estroma submesotelial, alteran la integridad del mesotelio y del espacio submesotelial de la pared abdominal, lo que por una parte podría comprometer la capacidad del sistema inmune de la cavidad peritoneal para combatir nuevas infecciones y el crecimiento de tumores, y por otra aumentar la susceptibilidad de la pared peritoneal al desarrollo de metástasis de tumores peritoneales.

DISCUSIÓN

PAPEL DE LOS LPMs EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN INTRAPERITONEAL CON *E. COLI*

Los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral han demostrado que los LPMs, la población hematopoyética más abundante en la cavidad peritoneal en condiciones de reposo, tienen un papel determinante en el control de la infección bacteriana durante el curso de una sepsis peritoneal. Nuestros datos demuestran que los LPMs son capaces de internalizar un número elevado de *E. coli* en los primeros minutos p.i. -una de las bacterias gram negativas que se detectan más frecuentemente en los pacientes sépticos-, controlando la infección a nivel local, e impidiendo con ello una diseminación masiva de la bacteria a la periferia, uno de los eventos que tienen mayor impacto en la severidad de la sepsis peritoneal.

Estudios previos han puesto de manifiesto que los LPMs son capaces de responder rápida y activamente ante diferentes estímulos inflamatorios. En este sentido, se ha descrito que los LPMs producen óxido nítrico tras la estimulación *in vivo* e *in vitro* con LPS, así como producen diferentes mediadores inflamatorios como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, o TNF- α tras ser estimulados *ex vivo* con el sobrenadante procedente del cultivo de *Staphylococcus epidermidis* (SES) (Dioszeghy et al., 2008). En línea con estas afirmaciones, se ha propuesto que la producción de quimioquinas como CXCL1 y CXCL2 por los LPMs (Dioszeghy et al., 2008) promueve el reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal durante las primeras horas tras la administración de tioglicolato o LPS (Cailhier et al., 2005; De Filippo et al., 2013). Además de amplificar la respuesta inflamatoria mediante la producción de diferentes mediadores, se ha propuesto que los LPMs también participan en la reparación de la superficie hepática cuando ésta ha sido dañada experimentalmente. En este sentido, el trabajo desarrollado por Wang y colaboradores, ha descrito que los LPMs son capaces de detectar *in vivo* señales daño endógenas, como ATP, fenómeno que induce su migración a la superficie del hígado, donde favorece la revascularización de la zona dañada,

facilitando con ello la recuperación tisular (Wang and Kubes, 2016).

Sin embargo, existen pocos trabajos que hayan abordado en detalle la contribución de los LPMs tanto en control como en la resolución de infecciones bacterianas. En este sentido, la capacidad de los LPMs para combatir infecciones ha sido abordada indirectamente en diferentes estudios, en los cuales se ha demostrado que los LPMs son capaces de internalizar *E. coli in vivo* e *in vitro* (Ghosn et al., 2010; Dahdah et al., 2014), proceso que está estrechamente regulado por los mastocitos de la cavidad peritoneal (Dahdah et al., 2014). Más recientemente, se ha descrito que los LPMs también internalizan *Staphylococcus aureus* en un modelo de infección en el que la bacteria, que es administrada por vía intravenosa, escapa desde hígado a la cavidad peritoneal (Jorch et al., 2019).

Si bien nuestros resultados han puesto de manifiesto el importante papel que desempeñan los LPMs en la contención de la infección intraperitoneal por *E. coli*, estudios previos han resaltado la contribución de los neutrófilos en el control de infecciones bacterianas en la cavidad peritoneal. Cabe mencionar que, durante un proceso de infección peritoneal, los neutrófilos acceden a la cavidad peritoneal a través del omento, donde participan en la fagocitosis del patógeno (Buscher et al., 2016). Asimismo, se ha propuesto que el reclutamiento temprano de neutrófilos durante proceso de sepsis inducido por CLP, favorece el aclaramiento de la infección en la cavidad peritoneal lo que conlleva una mejora en la tasa de supervivencia (Shen et al., 2017). Estos trabajos subrayan que los neutrófilos poseen una maquinaria celular que les permite controlar activamente la infección bacteriana en la cavidad peritoneal. Por su parte, nuestros datos demuestran que esta población inflamatoria no se recluta al peritoneo hasta los 60 minutos p.i., fase en la cual los LPMs, población celular más numerosa en condiciones de reposo, ya han eliminado una gran parte de la infección causada por *E. coli*. No obstante, nuestros datos sugieren que, en una fase posterior

de la infección, cuando los LPMs no son detectables en el lavado peritoneal, los neutrófilos si que contribuyen a la fagocitosis del patógeno, eliminando progresivamente la carga bacteriana presente en la cavidad peritoneal. Es interesante mencionar que este reclutamiento de neutrófilos continúa hasta fases más tardías de la infección (72 horas p.i.), fase en la que los neutrófilos se establecen como una de las poblaciones inflamatorias cuantitativamente más importantes en la cavidad peritoneal. A pesar de que en esta Tesis Doctoral no se ha abordado específicamente el papel de los neutrófilos en la fase de resolución de la infección, no podemos descartar que contribuyan significativamente a la erradicación progresiva de la carga bacteriana residual.

Con respecto a la participación de los SPMs en el control de la infección bacteriana, diversos trabajos han demostrado que los SPMs responden activamente durante un proceso inflamatorio, pues son capaces de internalizar bacterias y partículas de zymosan *in vivo* y de producir óxido nítrico en respuesta a la estimulación con productos microbianos como el LPS. (Cassado et al., 2015; Ghosn et al., 2010). Nuestros datos indican que los SPMs también participan en la captura de *E. coli* en los primeros minutos p.i.; sin embargo, su número es significativamente menor en comparación con los LPMs, por lo que la contribución de esta población a la eliminación de la infección se vería diluida por la fagocitosis llevada a cabo por los LPMs.

Con el objetivo de abordar las consecuencias de la ausencia de la población de LPMs en el curso de la infección peritoneal, utilizamos ratones Lysm-Gata6^{-/-} en los cuales se ha descrito que los LPMs están reducidos en número y presentan alteraciones en su metabolismo y supervivencia (Gautier et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014; Rosas et al., 2014). Nuestros datos demuestran, en base a los niveles de expresión de caspasa-3 activa en los agregados de macrófagos, así como mediante los análisis de muestras citocentrífugas de lavado peritoneal, que los LPMs en el modelo Lysm-Gata6^{-/-} presentan evidencias de baja viabilidad tras la infección i.p.

con *E. coli*. A pesar de estas alteraciones, no hemos encontrado diferencias significativas en términos de internalización de *E. coli*, formación de agregados, supervivencia y carga bacteriana entre ratones control y ratones Lysm-Gata6^{-/-}, en nuestro modelo de infección. Por ello, podríamos concluir que las deficiencias funcionales que han sido descritas en los ratones LysM-Gata6^{-/-}, que radican en una incapacidad parcial de polarizar a las células B1 peritoneales en condiciones de reposo, no parecen traducirse, en nuestro modelo de infección intraperitoneal por *E. coli*, en una menor capacidad de internalización y eliminación de la bacteria por los LPMs, a pesar de estar su número reducido. Sin embargo, no puede excluirse la existencia mecanismos que compensen la deficiencia numérica de los LPMs en los ratones LysM-Gata6^{-/-} y que contribuyan a explicar el hecho de que no se encuentren diferencias en el control de la infección entre ratones control y ratones LysM-Gata6^{-/-}.

Debido a que el modelo LysM-Gata6^{-/-} no nos permitió evaluar la contribución de los LPMs en el curso de la infección bacteriana, utilizamos la estrategia experimental basada en el uso de liposomas cargados con clodronato, herramienta ampliamente utilizada para eliminar población de macrófagos de distintas localizaciones. Así, nuestros resultados han confirmado el papel esencial de los macrófagos en la contención de la infección bacteriana, dado que la falta de LPMs al inicio de la infección, dispara no solo la carga bacteriana en la cavidad peritoneal, sino que promueve una mayor diseminación de la infección hacia la periferia.

A pesar del papel desempeñado por las células fagocíticas peritoneales, que en las primeras horas p.i. logran controlar localmente la infección bacteriana, nuestros datos reflejan que parte de la bacteria escapa de la cavidad peritoneal y se disemina a otros órganos periféricos durante las primeras 24 horas p.i. En este sentido, se puede especular que la diseminación de la infección bacteriana podría tener lugar por difusión de la bacteria libre a través de la circulación linfática, o bien en el interior de células

que hayan internalizado la bacteria. Nuestros datos reflejan que, en dichos órganos, esta infección es controlada paulatinamente hasta ser indetectable tras la primera semana p.i. En relación con los mecanismos encargados del control de la infección en periferia, los resultados obtenidos en el trabajo desarrollado por Clark y colaboradores demuestran que el mecanismo responsable de la contención de la infección en órganos como el hígado y el pulmón son las trampas extracelulares de neutrófilos o NETs (Clark et al., 2007). Estas estructuras, que eliminan la bacteria que llega a los sinusoides hepáticos y a los capilares pulmonares durante un proceso de sepsis peritoneal causan, de manera colateral, daño orgánico, hecho que explica el incremento en los valores de enzimas como AST o ALT detectados en el suero de ratones infectados en nuestro modelo de sepsis con *E. coli*.

EL FENÓMENO DE MDR RESPONDE A LA ADHESIÓN TRANSITORIA DE LOS LPMs AL MESOTELIO VISCERAL Y PARIETAL

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que durante la primera fase de la infección peritoneal por la cepa M6L4 de *E. coli*, cepa aislada del intestino de ratón, se produce la desaparición de la población de LPMs, los cuales no son recuperables al realizar un lavado peritoneal puesto que se encuentran adheridos a la superficie del mesotelio. Asimismo, nuestros datos demuestran que entre un 60 y un 70% de la población de LPMs existente antes del inicio de la infección, tras su transitoria adhesión al mesotelio, vuelven a ser recuperables en el lavado peritoneal en la fase de resolución de la infección.

El MDR, es decir, la desaparición de la población de LPMs durante el inicio de una respuesta inflamatoria en la cavidad peritoneal fue descrito a principio de los años 60 y, desde entonces, diversos trabajos han descrito este fenómeno en respuesta a diferentes estímulos proinflamatorios como son LPS (Ghosn et al., 2010; Okabe and Medzhitov, 2014), tioglicolato (Davies et al., 2013b; Ghosn et al., 2010),

zymosan (Davies et al., 2013b, 2011; Zhang et al., 2019), SES (Dioszeghy et al., 2008) y *Cryptosporidium parvum* (Haskill and Becker, 1985). Sin embargo, el mecanismo responsable de la desaparición de los LPMs durante una respuesta inflamatoria sigue siendo controvertido. En este sentido, se han propuesto tres mecanismos, que bien a nivel individual o de manera complementaria, explicarían el fenómeno de MDR: la migración de los LPMs al ganglio mediastínico que drena la cavidad peritoneal, la muerte de estos macrófagos a consecuencia del proceso inflamatorio, o la adhesión a la superficie peritoneal.

A pesar de que en numerosos trabajos se ha propuesto que el fenómeno de MDR responde a la migración de los LPMs a los ganglios linfáticos, esto sólo ha sido abordado en el trabajo original de Rosen y colaboradores (Rosen and Gordon, 1990), en el que describieron que tras transferir i.p. células de lavado peritoneal marcadas fluorescentemente, parte de ellas migraban a los ganglios que drenan la cavidad peritoneal. Sin embargo, mientras que en este trabajo interpretan que las células fluorescentes detectadas en los ganglios son macrófagos, la aproximación experimental utilizada no permite excluir que dichas células sean linfocitos, capaces de migrar al ganglio linfático en cuestión.

Por otro lado, otra de las explicaciones del fenómeno de MDR que ha sido ampliamente propuesta sugiere que, tal y como ocurre en otras localizaciones donde tras un proceso infeccioso o una agresión experimental en el tejido la población de macrófagos residentes resulta dañada, la desaparición de los LPMs podría responder a la muerte de éstos durante una respuesta inflamatoria en la cavidad peritoneal. Los resultados obtenidos en 1992 por Haskill y Becker, sugirieron que los macrófagos de la cavidad peritoneal, los cuales habían sido marcados fluorescentemente antes del inicio de la infección peritoneal con *C. parvum*, tras sufrir el proceso de MDR, reaparecían en el peritoneo volviendo a ser recuperables en el lavado peritoneal (Haskill and Becker, 1985). Por tanto, estos resultados sentaron las bases de la hipótesis que planteaba que, durante

el MDR, los macrófagos peritoneales no morían a consecuencia de la infección, sino que estaban alojados en la cavidad peritoneal, posiblemente adheridos al peritoneo, lo que impediría que fueran detectados al realizar un lavado peritoneal. Así, en la fase de resolución de la infección, estos macrófagos volverían a ser recuperables progresivamente en el lavado peritoneal. Dicha hipótesis ha sido apoyada por estudios más recientes en los que, a pesar de que no abordan lo que ocurre con los LPMs durante el MDR, caracterizan, en la fase tardía de la respuesta inflamatoria producida tras la administración de zymosan o de *SES*, una población en el lavado peritoneal que presenta un fenotipo semejante a los LPMs (Davies et al., 2013b; Dioszeghy et al., 2008). Sin embargo, los resultados de estos estudios no demuestran que los LPMs observados en esta fase sean los existentes antes de la inflamación peritoneal -como fue propuesto por *Haskill y colaboradores*-, ni descartan que la población de LPMs observada tras el MDR se haya generado *de novo* por los monocitos reclutados al peritoneo, los cuales tienen el potencial de adquirir un fenotipo semejante a los LPMs, como se ha mostrado en ensayos de irradiación o tras el tratamiento con tioglicolato (Bain et al., 2016; Liu et al., 2019).

Nuestros resultados, basados en los ensayos realizados mediante citometría de flujo y microscopía confocal, indican que tras el fenómeno de MDR, en el cual los LPMs se encuentran formando agregados sobre la superficie del mesotelio, los macrófagos vuelven a ser recuperables en el lavado peritoneal lo que sugiere que, a medida que la inflamación se reduce, los LPMs se desprenden progresivamente de estas estructuras. Por lo tanto, nuestros datos confirman que los LPMs observados en la fase de resolución de la infección son los mismos macrófagos existentes antes de la infección o provienen de la proliferación de estos, pero no de la formación *de novo* por monocitos inflamatorios. Cabe mencionar que en esta Tesis Doctoral no se ha abordado si la población de LPMs se mantiene intacta durante la infección bacteriana o si parte de la población de LPMs muere y se regenera mediante proliferación

local de los macrófagos supervivientes. No obstante, nuestros datos apoyarían el segundo escenario, puesto que la reducción en la señal Far Red⁺ de la población de LPMs observada durante la primera semana p.i. podría indicar que, durante la fase de resolución de la infección, los macrófagos que sobreviven a la respuesta inflamatoria entran en ciclo celular para regenerar, mediante autoproliferación, a la población completa de LPMs, como así se ha propuesto en otros estudios (Davies et al., 2013b, 2011).

En relación con el MDR, nuestros datos demuestran que los macrófagos forman agregados sobre el mesotelio visceral y parietal del peritoneo durante la infección intraperitoneal con *E. coli*. La adhesión y agregación de células peritoneales al mesotelio fue inicialmente descrita en 1983 en respuesta a la estimulación intraperitoneal con toxina bacteriana complementada con adyuvante completo de Freund (Leak, 1983). Estas observaciones se extendieron en estudios posteriores en los que, mediante análisis llevados a cabo por microscopía óptica y electrónica, utilizando los mismos estímulos, observaron a las 24 horas p.i. macrófagos adheridos al mesotelio y, tras una semana p.i. la formación de agregados (Leak, 1985). Más recientemente, Zhang y colaboradores han propuesto, en un modelo basado en la administración de zymosan o *E. coli*, que el fenómeno de MDR responde principalmente a la formación de coágulos, estructuras que contienen LPMs y que están libres en el fluido peritoneal, proceso dependiente del factor V de la coagulación (Zhang et al., 2019). Estos datos podrían reflejar que, efectivamente, se forman grandes agregados de macrófagos no adherentes, posiblemente a consecuencia de la alta dosis de zymosan administrada (entre 10-100 veces más de la dosis utilizada por otros estudios recientes en los que evalúan el MDR) que podría inducir, muerte celular-como ha sido recientemente (Liu et al., 2019)- hemorragia y la consecuente activación de los factores de coagulación. Por otra parte, estos autores también describen la adhesión de los LPMs al mesotelio en respuesta a infección por *E. coli* inactivada por calor,

así como la formación de coágulos similares a los descritos en los experimentos con zymosan, tras la inyección de *E. coli*-GFP. La diferencia entre esta observación y nuestros resultados, que muestran la formación de grandes agregados multicelulares adheridos al mesotelio tras infección por *E. coli*, puede deberse a que en los experimentos descritos por Zhang y colaboradores, los agregados se hayan desprendido del mesotelio durante el procesamiento de la muestra o, alternativamente, que una alta dosis de bacteria haya causado la formación de dichos coágulos, tal y como hemos argumentado en el caso de los experimentos con zymosan. Las imágenes de microscopia mostradas en este estudio parecen confirmar esta hipótesis, ya que la densidad de bacterias presente en dichos coágulos es infinitamente mayor a la observada en los agregados descritos en nuestros experimentos.

LA FORMACIÓN DE AGREGADOS DE MACRÓFAGOS DURANTE LA INFECCIÓN BACTERIANA ALTERA LA BARRERA MESOTELIAL

Nuestros resultados demuestran que la infección intraperitoneal con *E. coli* induce la adhesión de los LPMs al mesotelio parietal, que cubre la pared peritoneal, y al mesotelio visceral, que tapiza órganos abdominales como el omento, la pared intestinal, la grasa gonadal y el mesenterio. A diferencia de macrófagos residentes de otras localizaciones, los cuales son sésiles y residen en un estroma muy compacto y organizado (Blériot et al., 2015; Sierro et al., 2017; Uderhardt et al., 2019), los macrófagos peritoneales están en constante movimiento por la cavidad peritoneal (Zhang et al., 2019). Esta distribución homogénea de los LPMs en el fluido peritoneal facilita que sean capaces de detectar de forma inmediata cualquier agresión que tenga lugar en la cavidad peritoneal. En este contexto, los análisis llevados a cabo mediante microscopía óptica y citometría de flujo demuestran que los LPMs detectan rápidamente la presencia de *E. coli* en el fluido peritoneal, internalizando en sólo 30 minutos el 60% de las bacterias inoculadas. Esta

rápida captura del patógeno tiene lugar de forma manera paralela a la formación de agregados de macrófagos, que contienen *E. coli* sobre el mesotelio peritoneal, lo que sugeriría que la internalización de la bacteria induce la activación, y consecuente adhesión, de los LPMs a la barrera mesotelial.

Es importante mencionar que los agregados observados sobre la pared peritoneal durante las primeras horas p.i. son agregados multiestratificados que están formados principalmente por LPMs, neutrófilos y células B. En este sentido, la formación estos agregados, en respuesta a la infección por *E. coli*, no es dependiente de la presencia de neutrófilos o células B, dado que se ha detectado la formación de estas estructuras tanto tras eliminar la población de neutrófilos (utilizando el anticuerpo citotóxico anti-Ly6G) como mediante el análisis de ratones *XID^{-/-}* que tienen reducida la población de células B1 peritoneales (datos no mostrados). Sin embargo, nuestros resultados, basados en el uso de liposomas con clodronato, han puesto de manifiesto que la adhesión inicial de los LPMs al mesotelio es esencial para la formación de estos agregados multicelulares, puesto que ni los neutrófilos ni las células B se adhieren a la barrera mesotelial en ausencia de LPMs.

En relación con el papel que desempeñan las células B en estos agregados, un estudio reciente (Pereira et al., 2019) ha propuesto que las células B1 peritoneales potencian la actividad microbicida de los macrófagos peritoneales en un modelo de infección con *Encephalitozoon cuniculi*. Basándonos en estos datos, la presencia de células B1 en los agregados de macrófagos podría promover la eliminación eficaz de la bacteria internalizada por los LPMs.

Con respecto al rol de los neutrófilos en estas estructuras, nuestros datos reflejan que durante las primeras horas p.i., los neutrófilos son reclutados a la cavidad peritoneal y se incorporan a los agregados de macrófagos formados sobre la pared del peritoneo. La migración de los neutrófilos a estas estructuras podría responder al gradiente quimiotáctico creado por CXCL1, CXCL2 producido tanto por los LPMs

como por las células mesoteliales activadas en la zona del agregado, quimioquinas producidas por ambos tipos celulares tras su estimulación (Cailhier et al., 2005; Eigenbrod et al., 2008). Con respecto al impacto de la migración de estas células inflamatorias a los agregados formados sobre la pared peritoneal, un estudio reciente ha demostrado que los neutrófilos repercuten negativamente en la reparación del mesotelio dañado, favoreciendo con ello la formación de adhesiones peritoneales (Tsai et al., 2019). Por ello, teniendo en cuenta estos datos, si bien los neutrófilos podrían participar en la eliminación de *E. coli* en los agregados multicelulares formados sobre la pared peritoneal, la presencia de estas células inflamatorias que contienen numerosas enzimas proteolíticas, péptidos microbianos y ROS, podría agravar el daño mesotelial observado a consecuencia de la formación de estas estructuras, durante la infección con *E. coli*.

Diversos estudios han demostrado que las células mesoteliales que conforman el mesotelio se activan rápidamente tras reconocer componentes bacterianos, como flagelina o LPS, o tras la estimulación con diferentes citoquinas (Colmont et al., 2011; Eigenbrod et al., 2008; Park et al., 2007; Yao et al., 2004). Este reconocimiento induce, por un lado, la producción de mediadores inflamatorios como IL-1, TNF- α o IL-6, así como incrementa la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 -ligando de CD11b-, mecanismos que podrían ser responsables de la migración y adhesión de los LPMs a la superficie del mesotelio (Jonji et al., 1992).

Los agregados formados sobre la pared peritoneal en nuestro modelo de infección i.p. con *E. coli* podrían asemejarse a los granulomas formados durante la infección con micobacterias, puesto que ambas estructuras están constituidas por agregados multicelulares (formados principalmente por macrófagos, linfocitos y neutrófilos) que han internalizado bacteria y se organizan de manera dinámica y estructurada (Harding et al., 2019). En el contexto del granuloma, la adhesión de los macrófagos es determinante para la contención de

los patógenos internalizados. Está aún por esclarecer si en nuestro modelo de infección intraperitoneal, la formación de agregados sobre el mesotelio peritoneal confiere una ventaja en la eliminación completa de las bacterias internalizadas por los LPMs. En este sentido, con el objetivo de abordar la relevancia funcional de los agregados de LPMs formados sobre la pared peritoneal durante la infección por *E. coli*, se están desarrollando distintos modelos experimentales en nuestro laboratorio destinados a bloquear la formación de dichos agregados con el fin de explorar la importancia de estas estructuras en la defensa frente a infecciones bacterianas en la cavidad peritoneal.

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que la formación de los agregados multicelulares sobre la superficie mesotelial en las primeras 4 horas p.i. desestabiliza la barrera mesotelial, alterando las uniones intercelulares que anclan eficazmente a las células mesoteliales entre sí, uniones esenciales para el mantenimiento de esta barrera que limita y protege la cavidad peritoneal. En línea con estos datos, se ha propuesto que TNF- α induce la contracción de las células mesoteliales, cambio morfológico que altera la continuidad de la barrera mesotelial (Yonemura et al., 1997). Dado que los LPMs producen TNF- α tras ser estimulados con diferentes agentes proinflamatorios (Dioszeghy et al., 2008; Leendertse et al., 2009), se podría especular que la producción de este mediador por parte de los LPMs adheridos, podría ser uno de los responsables de la contracción y posterior formación de discontinuidades en el mesotelio peritoneal durante la infección i.p. con *E. coli*.

En nuestro modelo experimental, tras 4 días p.i. el espacio submesotelial está cubierto por macrófagos inflamatorios F4/80^{int/+} Tim4⁻, tal y como muestran los análisis llevados a cabo mediante microscopía óptica y microscopía confocal. Estos macrófagos inflamatorios, que se diferencian a partir de monocitos que son reclutados a la cavidad peritoneal a día 1 p.i., podrían invadir el estroma submesotelial a través de las discontinuidades formadas en el mesotelio durante la infección bacteriana. En este sentido, el

estudio llevado a cabo por Gong y colaboradores propone que la inflamación peritoneal producida tras la administración de tioglicolato induce la migración de macrófagos derivados de monocitos al estroma submesotelial, donde alteran la matriz extracelular, degradando el colágeno tipo IV presente en la membrana basal mesotelial, proceso dependiente de la activación metaloproteinasa 9 (Gong et al., 2008). Teniendo en cuenta estos datos, la fuerte infiltración submesotelial en nuestro modelo de infección i.p. con *E. coli* podría agudizar la desorganización del peritoneo parietal observado durante la infección bacteriana. Actualmente en nuestro grupo se están llevando a cabo experimentos con el objetivo de abordar si estos macrófagos inflamatorios participan en la eliminación de la bacteria, así como si acceden al área submesotelial a través de los agregados de LPMs – dado que la membrana mesotelial existente en estas áreas está muy desorganizada- o si estos macrófagos han desarrollado mecanismos que les permiten dañar la barrera mesotelial y migrar consecuentemente al espacio submesotelial.

Tal y como se citó en el apartado de Introducción de esta Tesis Doctoral, el mesotelio peritoneal desempeña funciones esenciales para mantenimiento de la homeostasis peritoneal. Así, en condiciones de reposo, el mesotelio peritoneal actúa como una barrera que permite el paso controlado de fluido y de pequeños solutos, a favor de gradiente osmótico, entre la luz peritoneal y los vasos que irrigan la pared peritoneal. Este proceso es la base de la diálisis peritoneal, tratamiento que se proporciona a pacientes con insuficiencia renal crónica, los cuales no pueden eliminar las toxinas presentes en la sangre por vía renal. En este sentido, el estudio desarrollado por Margetts y colaboradores demuestra que, durante una peritonitis no infecciosa, se producen alteraciones en la membrana peritoneal -semejantes a las detectadas en nuestro modelo de infección a día 4 p.i.- (morfología cuboidal en las células mesoteliales, presencia de discontinuidades y fuerte infiltración de células inflamatorias en el estroma submesotelial), que se han asociado con una mayor permeabilidad en la barrera mesotelial,

que en consecuencia, no controla el paso de solutos a su través, provocando con ello, un fallo en su capacidad de ultrafiltración (Margetts et al., 2002). Estos datos sugieren que la desorganización de la barrera mesotelial observada durante la infección intraperitoneal con *E. coli*, causada tanto por la formación de agregados multicelulares como por la fuerte infiltración submesotelial de células inflamatorias, debilitaría la membrana mesotelial, que perdería transitoriamente su función limitante y protectora

En la fase de resolución de la infección, cuando apenas se detectan células inflamatorias y la infección ha sido controlada, nuestros datos reflejan que el mesotelio, que ha sido profundamente dañado en la fase aguda de la infección bacteriana, comienza a ser reparado. El mecanismo responsable de la reparación del mesotelio dañado sigue siendo controvertido, dado que la mayor parte de los mecanismos que se han propuesto han sido identificados *in vitro*, y la contribución de cada uno de ellos *in vivo* ha de ser validada. Se ha propuesto que la reparación del mesotelio dañado puede producirse bien por la migración de células mesoteliales desde zonas cercanas a la zona alterada, las cuales se separan de su membrana basal y, a través del fluido peritoneal, llegan a la zona dañada donde proliferan y repueblan la zona mesotelial alterada (Foley-Comer et al. 2002); por la diferenciación de las células precursoras multipotentes presentes en el estroma submesotelial (Mustaets et al. 2002); o por la proliferación puntual de las células que rodean la zona mesotelial dañada (Mustaets et al. 2004). En este sentido, nuestros resultados demuestran que, en la fase de resolución de la infección, las células mesoteliales que rodean algunas zonas dañadas de la pared peritoneal expresan el marcador de proliferación Ki67, lo que sugiere que la proliferación de las células mesoteliales que se encuentran próximas a la zona dañada, participa en la reparación del mesotelio en nuestro modelo de infección con *E. coli*.

Sin embargo, en esta fase del proceso infeccioso también se han detectado áreas del mesotelio

que presentan evidencias de una importante desorganización, poniendo de manifiesto que la infección intraperitoneal daña profundamente el mesotelio, dejando expuesto el estroma submesotelial. Diversos estudios han correlacionado la alteración en el mesotelio peritoneal con una mayor susceptibilidad ante la invasión del espacio submesotelial por las células tumorales. Por otra parte, se ha propuesto que el estroma submesotelial constituye un entorno que favorece significativamente la implantación tumoral, por lo que la invasión del espacio submesotelial por las células tumorales se ha asociado con un mayor desarrollo tumoral y un peor pronóstico clínico (Mikuła-Pietrasik et al., 2018; Yonemura et al., 1997). Basándonos en estos datos se podría hipotetizar que la formación de agregados durante el curso de un proceso infeccioso en la cavidad peritoneal debilita la pared peritoneal, alterando las funciones desempeñadas por el mesotelio en condiciones homeostáticas, y provocando que esta barrera sea más susceptible a una implantación tumoral posterior.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En el modelo experimental de infección bacteriana utilizado en este trabajo, basado en la inyección intraperitoneal de una dosis subletal de la cepa M6L4 de *E. coli*, los LPMs, macrófagos peritoneales residentes, actúan como primera línea de defensa del sistema inmune innato, eliminando un 60% de las bacterias inoculadas durante los primeros 30 minutos postinfección. Esto contribuye en gran medida a una reducción del 90% en la carga bacteriana de la cavidad peritoneal, durante las primeras horas postinfección.
2. A pesar del eficaz aclaramiento bacteriano inicial, a las 24 horas, la infección se extiende a órganos intraperitoneales (como el omento) y extraperitoneales (como el ganglio mediastínico y el pulmón) provocando un cuadro de sepsis, tal y como revelan los altos niveles séricos de enzimas asociadas con disfunción hepática, cardíaca y/o renal (como AST, ALT, LDH y CK). Sin embargo, la infección resulta controlada a lo largo de la primera semana postinfección.
3. Durante las primeras horas postinfección, la internalización de *E. coli* por los LPMs es concomitante con su adhesión al mesotelio que recubre la pared peritoneal, lo que resulta en la formación de agregados de macrófagos. La formación de estos agregados adheridos al mesotelio, que también ocurre en el omento, mesenterio, grasa gonadal y pared intestinal, explica el fenómeno de MDR en nuestro modelo experimental.
4. Los agregados de macrófagos presentes en la pared peritoneal durante las primeras horas postinfección son estructuras complejas, multiestratificadas, adheridas al mesotelio. Están constituidos principalmente por LPMs, células B1 y neutrófilos, siendo también detectable un número bajo de células T, mastocitos y plaquetas.
5. La formación de los agregados de macrófagos provoca una importante desorganización de las células mesoteliales a las que éstos se adhieren, así como de aquellas que rodean dichos agregados, lo que provoca la disrupción de las uniones estrechas entre las células mesoteliales y la existencia de discontinuidades entre éstas.
6. A lo largo de los primeros días postinfección la desorganización del mesotelio permite la migración de los LPMs que forman parte de los agregados, tanto alrededor de éstos, como al espacio submesotelial. Paralelamente se produce una importante infiltración de macrófagos de origen monocítico F4/80^{int} Tim4⁺ y neutrófilos al espacio submesotelial, tanto en zonas ocupadas por agregados, como en zonas libres de éstos, lo que provoca la pérdida de la integridad mesotelial.
7. Durante la resolución de la infección, que ocurre a lo largo de la primera semana tras la inyección intraperitoneal de *E. coli*, desaparecen progresivamente los agregados de macrófagos y la infiltración submesotelial; sin embargo, el mesotelio presenta zonas en las que lesiones provocadas por la infiltración de LPMs, macrófagos inflamatorios y neutrófilos no han sido completamente reparadas, resultando en un daño residual en el mesotelio una vez controlada la infección.

BIBLIOGRAFÍA

- Altorki, N.K., Markowitz, G.J., Gao, D., Port, J.L., Saxena, A., Stiles, B., McGraw, T., Mittal, V., 2019. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 19, 9–31.
- Angus, D.C., Van Der Poll, T., 2013. Severe sepsis and septic shock. *NEJM* 369, 840–851.
- Ansel, K.M., Harris, R.B.S., Cyster, J.G., 2002. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16, 67–76.
- Bain, C.C., Hawley, C.A., Garner, H., Scott, C.L., Schridde, A., Steers, N.J., Mack, M., Joshi, A., Williams, M., Mowat, A.M.I., Geissmann, F., Jenkins, S.J., 2016. Long-lived self-renewing bone marrow-derived macrophages displace embryo-derived cells to inhabit adult serous cavities. *Nat. Commun.* 7:11852
- Barth, M.W., Hendrzak, J.A., Melnicoff, M.J., Morahan, P.S., 1995. Review of the macrophage disappearance reaction. *J. Leukoc. Biol.* 57, 361–366
- Benezech, C., Luu, N.T., Walker, J.A., Kruglov, A.A., Loo, Y., Nakamura, K., Zhang, Y., Nayar, S., Jones, L.H., Flores-Langarica, A., McIntosh, A., Marshall, J., Barone, F., Besra, G., Miles, K., Allen, J.E., Gray, M., Kollias, G., Cunningham, A.F., Withers, D.R., Toellner, K.M., Jones, N.D., Veldhoen, M., Nedospasov, S.A., McKenzie, A.N., Caamano, J.H., 2015. Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters. *Nat Immunol* 16, 819–828.
- Berberich, S., Dahne, S., Schippers, A., Peters, T., Muller, W., Kremmer, E., Forster, R., Pabst, O., 2014. Differential Molecular and Anatomical Basis for B Cell Migration into the Peritoneal Cavity and Omental Milky Spots. *J. Immunol.* 180, 2196–2203.
- Bird, S.D., 2004. Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces. *Cell Biol. Int.* 28, 151–159.
- Blériot, C., Dupuis, T., Jouvion, G., Eberl, G., Disson, O., Lecuit, M., 2015. Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* 42, 145–158.
- Boulanger, E., Wautier, M.P., Wautier, J.L., Boval, B., Panis, Y., Wernert, N., Danze, P.M., Dequiedt, P., 2002. AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int.* 61, 148–156.
- Buechler, M.B., Kim, K.-W., Onufer, E.J., Williams, J.W., Little, C.C., Dominguez, C.X., Li, Q., Sandoval, W., Cooper, J.E., Harris, C.A., Junttila, M.R., Randolph, G.J., Turley, S.J., 2019. A Stromal Niche Defined by Expression of the Transcription Factor WT1 Mediates Programming and Homeostasis of Cavity-Resident Macrophages. *Immunity.* 51, 119–130.
- Buscher, K., Wang, H., Zhang, X., Striewski, P., Wirth, B., Saggi, G., Lütke-Enking, S., Mayadas, T.N., Ley, K., Sorokin, L., Song, J., 2016. Protection from septic peritonitis by rapid neutrophil recruitment through omental high endothelial venules. *Nat. Commun.* 7, 1–7.
- Cailhier, J.F., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Ko, K., Watson, S., Savill, J., Hughes, J., Lang, R.A., 2005. Conditional Macrophage Ablation Demonstrates That Resident Macrophages Initiate Acute Peritoneal Inflammation. *J. Immunol.* 174, 2336–2342.
- Cassado, A.A., D’Império Lima, M.R., Bortoluci, K.R., 2015. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. *Front. Immunol.* 6, 1–9.
- Chkourko Gusky, H., Diedrich, J., MacDougald, O.A., Podgorski, I., 2016. Omentum and bone

- marrow: how adipocyte-rich organs create tumour microenvironments conducive for metastatic progression. *Obes. Rev.* **17**, 1015–1029.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K., Chakrabarti, S., Paul, K., 2007. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* **13**, 463–469.
- Coccolini, F., Gheza, F., Lotti, M., Virzi, S., Iusco, D., Ghermandi, C., Melotti, R., Baiocchi, G., Giulini, S.M., Ansaloni, L., Catena, F., 2013. Peritoneal carcinomatosis. *World J. Gastroenterol.* **19**, 6979–6994.
- Colmont, C.S., Raby, A.C., Dioszeghy, V., Lebouder, E., Foster, T.L., Jones, S.A., Labéta, M.O., Fielding, C.A., Topley, N., 2011. Human peritoneal mesothelial cells respond to bacterial ligands through a specific subset of Toll-like receptors. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 4079–4090.
- Daems, W.T., De Bakker, J.M., 1982. Do Resident Macrophages Proliferate? *Immunobiology* **161**, 204–211.
- Dahdah, A., Gautier, G., Attout, T., Fiore, F., Lebourdais, E., Msallam, R., Daeron, M., Monteiro, R.C., Benhamou, M., Charles, N., Davoust, J., Blank, U., Malissen, B., Launay, P., 2014. Mast cells aggravate sepsis by inhibiting peritoneal macrophage phagocytosis. *J. Clin. Invest.* **124**, 4577–4589.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R., 2013a. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* **14**, 986–995.
- Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C. Te, Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., Taylor, P.R., 2013b. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat. Commun.* **4**, 1–10.
- Davies, L.C., Rosas, M., Smith, P.J., Fraser, D.J., Jones, S.A., Taylor, P.R., 2011. A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2155–2164.
- De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., Van Rooijen, N., Hartmann, K., Gunzer, M., Roers, A., Hogg, N., 2013. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* **121**, 4930–4937.
- Deitch, E.A., 2005. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock.* **1**, 19–23
- Dejager, L., Pinheiro, I., Dejonckheere, E., Libert, C., 2011. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* **19**, 198–208.
- Dioszeghy, V., Rosas, M., Maskrey, B.H., Colmont, C., Topley, N., Chaitidis, P., Kuhn, H., Jones, S.A., Taylor, P.R., O'Donnell, V.B., 2008. 12/15-Lipoxygenase Regulates the Inflammatory Response to Bacterial Products In Vivo. *J. Immunol.* **181**, 6514–6524.
- Eigenbrod, T., Park, J.-H., Harder, J., Iwakura, Y., Núñez, G., 2008. Cutting Edge: Critical Role for Mesothelial Cells in Necrosis-Induced Inflammation through the Recognition of IL-1 Released from Dying Cells. *J. Immunol.* **181**, 8194–8198.
- Frankenberg, T., Kirschnek, S., Häcker, H., Häcker, G., 2008. Phagocytosis-induced apoptosis of macrophages is linked to uptake, killing and degradation of bacteria. *Eur. J. Immunol.* **38**, 204–215.
- Gautier, E.L., Ivanov, S., Williams, J.W., Huang, S.C.-C., Marcelin, G., Fairfax, K., Wang, P.L., Francis, J.S., Leone, P., Wilson, D.B., Artyomov, M.N., Pearce, E.J., Randolph, G.J., 2014. Gata6 regulates aspartoacylase expression in resident

- p>peritoneal macrophages and controls their survival.
- J. Exp. Med.*
- 211, 1525–1531.
- Gautier, E.L., Vanov, S., Lesnik, P., Randolph, G.J., 2013. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122, 2714–2722.
- Gerber, S.A., Rybalko, V.Y., Bigelow, C.E., Lugade, A.A., Foster, T.H., Frelinger, J.G., Lord, E.M., 2006. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am. J. Pathol.* 169, 1739–1752.
- Ghosh, E.E.B., Cassado, A.A., Govoni, G.R., Fukuhara, T., Yang, Y., Monack, D.M., Bortoluci, K.R., Almeida, S.R., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 2010. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2568–2573.
- Goldsmith, H.S., 1994. Brain and spinal cord revascularization by omental transposition. *Neurol. Res.* 16, 159–162.
- Gong, Y., Hart, E., Shchurin, A., Hoover-Plow, J., 2008. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 by plasminogen in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3012–3024.
- Gordon, S., 2016. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* 44, 463–475.
- Harding, J.S., Herbath, M., Chen, Y., Rayasam, A., Ritter, A., Csoka, B., Hasko, G., Michael, I.P., Fabry, Z., Nagy, A., Sandor, M., 2019. VEGF-A from Granuloma Macrophages Regulates Granulomatous Inflammation by a Non-angiogenic Pathway during Mycobacterial Infection. *Cell Rep.* 27, 2119–2131.e6.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
- Haskill, S., Becker, S., 1985. Disappearance and reappearance of resident macrophages: Importance in *C. parvum*-induced tumoricidal activity. *Cell. Immunol.* 90, 179–189.
- Heath, R.M., Jayne, D.G., O’Leary, R., Morrison, E.E., Guillo, P.J., 2004. Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: A mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction. *Br. J. Cancer* 90, 1437–1442.
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F.F., See, P., Beaudin, A.E., Lum, J., Low, I., Forsberg, E.C., Poidinger, M., Zolezzi, F., Larbi, A., Ng, L.G., Chan, J.K.Y., Greter, M., Becher, B., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F., 2015. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* 42, 665–678.
- Isaza-Restrepo, A., Martin-Saavedra, J.S., Velez-Leal, J.L., Vargas-Barato, F., Riveros-Dueñas, R., 2018. The peritoneum: Beyond the tissue - A review. *Front. Physiol.* 9, 1–12.
- Iwanicki, M.P., Davidowitz, R.A., Ng, M.R., Besser, A., Muranen, T., Merritt, M., Danuser, G., Ince, T., Brugge, J.S., 2011. Ovarian cancer spheroids use myosin-generated force to clear the mesothelium. *Cancer Discov.* 1, 144–157.
- Jackson-Jones, L.H., Duncan, S.M., Magalhaes, M.S., Campbell, S.M., Maizels, R.M., McSorley, H.J., Allen, J.E., Bénézech, C., 2016. Fat-associated lymphoid clusters control local IgM secretion during pleural infection and lung inflammation. *Nat. Commun.* 7, 1–14.
- Ji, H.-L., Nie, H.-G., 2008. Electrolyte and Fluid

- Transport in Mesothelial Cells. *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* **1**, 1–7.
- Jonji, B.N., Peri, G., Bernasconi, S., Sciacca, F.L., Colotta, F., Pelicci, P., Lanfranccone, L., Mantovani, A., Perugia, U., 1992. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J. Exp. Med.* **176**, 1165–1174.
- Jorch, S.K., Hickey, M.J., Kubes, P., Jorch, S.K., Surewaard, B.G.J., Hossain, M., Peiseler, M., Deppermann, C., Deng, J., Bogoslawski, A., Wal, F., Van Der, Omri, A., Hickey, M.J., Kubes, P., 2019. Peritoneal GATA6 + macrophages function as a portal for *Staphylococcus aureus* dissemination. *J Clin Invest.* **129**, 4643–4656.
- Kim, K.-W., Williams, J.W., Wang, Y.-T., Ivanov, S., Gilfillan, S., Colonna, M., Virgin, H.W., Gautier, E.L., Randolph, G.J., 2016. MHC II + resident peritoneal and pleural macrophages rely on IRF4 for development from circulating monocytes. *J. Exp. Med.* **213**, 1951–1959.
- Leak, L. V., 1983. Interaction of mesothelium to intraperitoneal stimulation I. Aggregation of peritoneal cells. *Lab Invest.* **48**, 479–491.
- Leak, L.V., 1985. Interaction of the peritoneal cavity to intraperitoneal stimulation: A peritoneal model system to monitor cellular and extracellular events in the formation of granulation tissue. *Am. J. Anat.* **173**, 171–183.
- Leendertse, M., Willems, R.J.L., Giebelen, I.A.J., Roelofs, J.J.T.H., van Rooijen, N., Bonten, M.J.M., van der Poll, T., 2009. Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice. *Innate Immun.* **15**, 3–12.
- Liao, C. Te, Rosas, M., Davies, L.C., Giles, P.J., Tyrrell, V.J., O'Donnell, V.B., Topley, N., Humphreys, I.R., Fraser, D.J., Jones, S.A., Taylor, P.R., 2016. IL-10 differentially controls the infiltration of inflammatory macrophages and antigen-presenting cells during inflammation. *Eur. J. Immunol.* **46**, 2222–2232.
- Liu, Zhaoyuan, Gu, Y., Chakarov, S., Bleriot, C., Kwok, I., Chen, X., Shin, A., Huang, W., Dress, R.J., Dutertre, C.-A., Schlitzer, A., Chen, J., Ng, L.G., Wang, H., Liu, Zhiduo, Su, B., Ginhoux, F., 2019. Fate Mapping via Ms4a3-Expression History Traces Monocyte-Derived Cells. *Cell* **178**, 1509–1525.e19.
- Lynch, L., O'Shea, D., Winter, D.C., Geoghegan, J., Doherty, D.G., O'Farrelly, C., 2009. Invariant NKT cells and CD1d+ cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1893–1901.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 519–531.
- Margetts, P.J., Kolb, M., Yu, L., Hoff, C.M., Holmes, C.J., Anthony, D.C., Gauldie, J., 2002. Animal Model in the Rat Peritoneum. *Am. J. Pathol.* **160**, 2285–2294.
- McDonald, B., Urrutia, R., Yipp, B.G., Jenne, C.N., Kubes, P., 2012. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* **12**, 324–333.
- Meza-Perez, S., Randall, T.D., 2017. Immunological Functions of the omentum. *Trends Immunol.* **38**, 91–136.
- Michailova, K., Wassilev, W., Wedel, T., 1999. Scanning and transmission electron microscopic study of visceral and parietal peritoneal regions in the rat. *Ann. Anat.* **181**, 253–260.

- Mikuła-Pietrasik, J., Uruski, P., Tykarski, A., Książek, K., 2018. The peritoneal "soil" for a cancerous "seed": a comprehensive review of the pathogenesis of intraperitoneal cancer metastases. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 509–525.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., Nagata, S., 2007. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435–439.
- Mutsaers, S.E., 2004. The mesothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 9–16.
- Nemzek, J.A., Hugunin, K.M.S., Opp, M.R., 2008. Modeling sepsis in the laboratory: Merging sound science with animal well-being. *Comp. Med.* 58, 120–128.
- Newson, J., Stables, M., Karra, E., Arce-Vargas, F., Quezada, S., Motwani, M., Mack, M., Yona, S., Audzevich, T., Gilroy, D.W., 2014. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*. 124, 1748–1764.
- Nguyen, H.-H., Tran, B.-T., Muller, W., Jack, R.S., 2017. IL-10 Acts As a Developmental Switch Guiding Monocyte Differentiation to Macrophages during a Murine Peritoneal Infection. *J. Immunol.* 189, 3112–3120.
- Nishi, C., Toda, S., Segawa, K., Nagata, S., 2014. Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1512–20.
- Okabe, Y., Medzhitov, R., 2014. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 157, 832–844.
- Park, J.-H., Kim, Y.-G., Shaw, M., Kanneganti, T.-D., Fujimoto, Y., Fukase, K., Inohara, N., Nunez, G., 2007. Nod1/RICK and TLR Signaling Regulate Chemokine and Antimicrobial Innate Immune Responses in Mesothelial Cells. *J. Immunol.* 179, 514–521.
- Pereira, A., Marcelino Alvares-Saraiva, A., Toshie de Camargo Konno, F., Denelle Spadacci-Morena, D., Cristina Perez, E., Mariano, M., Anete Lallo, M., 2019. B-1 cell-mediated modulation of m1-macrophage profile can ameliorate microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 13, 1–22.
- Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., Cheng, H.-W., Onder, L., Printz, A., Mörbé, U., Novkovic, M., Li, C., Lopez-Macias, C., Buechler, M.B., Turley, S.J., Mack, M., Sonesson, C., Robinson, M.D., Scandella, E., Gommerman, J., Ludewig, B., 2018. Fibroblastic reticular cells initiate immune responses in visceral adipose tissues and secure peritoneal immunity. *Sci. Immunol.* 3, 1–12.
- Platell, C., Cooper, D., Papadimitriou, J.M.P., Hall, J.C., 2000. The omentum. *World J. Gastroenterol.* 6, 169–176.
- Prade, K.K., Nicholls, A.J., Wong, C.H.Y., 2018. Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell Tissue Res.* 371, 551–565.
- Ratajczak, M.Z., Jaskulski, D., Pojda, Z., Wiktor-Jedrzejczak, W., 1987. Omental lymphoid organ as a source of macrophage colony stimulating activity in peritoneal cavity. *Clin Exp Immunol* 69, 198–203.
- Reinhart, K., Bauer, M., Riedemann, N.C., Hartog, C.S., 2012. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 609–634.
- Riedemann, N.C., Ren-Feng G., W.P.A., 2003. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.* 9, 517–524.
- Rosas, M., Davies, L.C., Giles, P.J., Liao, C.-T., Kharfan, B., Stone, T.C., O'Donnell, V.B., Fraser, D.J., Jones, S.A., Taylor, P.R., 2014. The transcription

- factor Gata6 links tissue macrophage phenotype and proliferative renewal. *Science*. 344, 645–648.
- Rosen, H., Gordon, S., 1990. Adoptive transfer of fluorescence-labeled cells shows that resident peritoneal macrophages are able to migrate into specialized lymphoid organs and inflammatory sites in the mouse. *Eur. J. Immunol.* 20, 1251–1258.
- Roy, B., Brennecke, A.M., Agarwal, S., Krey, M., Düber, S., Weiss, S., 2013. An intrinsic propensity of murine peritoneal B1b cells to switch to IgA in presence of TGF- β and retinoic acid. *PLoS One* 8, 1–10.
- Shah, S., Lowery, E., Braun, R.K., Martin, A., Huang, N., Medina, M., Sethupathi, P., Seki, Y., Takami, M., Byrne, K., Wigfield, C., Love, R.B., Iwashima, M., 2012. Cellular basis of tissue regeneration by omentum. *PLoS One* 7, 1–11.
- Shen, X.F., Zhao, Yang, Cao, K., Guan, W.X., Li, X., Zhang, Q., Zhao, Yong, Ding, Y.T., Du, J.F., 2017. Wip1 deficiency promotes neutrophil recruitment to the infection site and improves sepsis outcome. *Front. Immunol.* 8, 1–10.
- Sheng, J., Ruedl, C., Karjalainen, K., 2015. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* 43, 382–393.
- Sierro, F., Evrard, M., Rizzetto, S., Melino, M., Mitchell, A.J., Florido, M., Beattie, L., Walters, S.B., Tay, S.S., Lu, B., Holz, L.E., Roediger, B., Wong, Y.C., Warren, A., Ritchie, W., McGuffog, C., Weninger, W., Le Couteur, D.G., Ginhoux, F., Britton, W.J., Heath, W.R., Saunders, B.M., McCaughan, G.W., Luciani, F., MacDonald, K.P.A., Ng, L.G., Bowen, D.G., Bertolino, P., 2017. A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment. *Immunity*. 47, 374–388.
- Stommel, M.W.J., Strik, C., van Goor, H., 2014. Response to pathological processes in the peritoneal cavity-Sepsis, tumours, adhesions, and ascites. *Semin. Pediatr. Surg.* 23, 331–335.
- Tsai, J.M., Shoham, M., Fernhoff, N.B., George, B.M., Marjon, K.D., Mccracken, M.N., Kao, K.S., Sinha, R., Volkmer, A.K., Miyanishi, M., Seita, J., Rinkevich, Y., Weissman, I.L., 2019. Neutrophil and monocyte kinetics play critical roles in mouse peritoneal adhesion formation. *Blood Adv.* 3, 1–3.
- Uderhardt, S., Martins, A.J., Tsang, J.S., Lämmermann, T., Germain, R.N., 2019. Resident Macrophages Cloak Tissue Microlesions to Prevent Neutrophil-Driven Inflammatory Damage. *Cell* 177, 541–555.
- van Baal, J.O.A.M., Van de Vijver, K.K., Nieuwland, R., van Noorden, C.J.F., van Driel, W.J., Sturk, A., Kenter, G.G., Rikkers, L.G., Lok, C.A.R., 2017. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell* 49, 95–105.
- Vasanthakumar, A., Moro, K., Xin, A., Liao, Y., Gloury, R., Kawamoto, S., Fagarasan, S., Mielke, L.A., Afshar-Sterle, S., Masters, S.L., Nakae, S., Saito, H., Wentworth, J.M., Li, P., Liao, W., Leonard, W.J., Smyth, G.K., Shi, W., Nutt, S.L., Koyasu, S., Kallies, A., 2015. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 16, 276–285.
- Vincent, J., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., 2009. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* 302, 2323–2329.
- Wang, J., Kubes, P., 2016. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* 165, 668–678.

- Wijffels, J.F.A.M., Hendrickx, R.J.B.M., Steenbergen, J.J.E., Eestermans, I.L., Beelen, R.H.J., 1992. Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages. *Res. Immunol.* **143**, 401–409.
- Wilkosz, S., Ireland, G., Khwaja, N., Walker, M., Butt, R., De Giorgio-Miller, A., Herrick, S.E., 2005. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat. Embryol.* **209**, 251–261.
- Wong, K., Valdez, P. a, Tan, C., Yeh, S., Hongo, J.-A., Ouyang, W., 2010. Phosphatidylserine receptor Tim-4 is essential for the maintenance of the homeostatic state of resident peritoneal macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8712–8717.
- Xiang, B., Zhang, G., Guo, L., Li, X.A., Morris, A.J., Daugherty, A., Whiteheart, S.W., Smyth, S.S., Li, Z., 2013. Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat. Commun.* **4**, 1–12.
- Yao, V., Platell, C., Hall, J.C., 2004. Peritoneal mesothelial cells produce inflammatory related cytokines. *ANZ J. Surg.* **74**, 997–1002.
- Yonemura, Y., Nojima, N., Kawamura, T., Fujita, H., Kaji, M., Ajisaka, H., Bandou, E., Endou, Y., Sasaki, T., Yamaguchi, T., Harada, S., Yamamoto, H., 1997. A possible role of cytokines in the formation of peritoneal dissemination. *Int. J. Oncol.* **11**, 349–358.
- Yung, S., Chan, T.M., 2012. Pathophysiological changes to the peritoneal membrane during PD-related peritonitis: The role of mesothelial cells. *Mediators Inflamm.* **2012**, 1–21.
- Zhang, N., Czepielewski, R.S., Jarjour, N.N., Erlich, E.C., Esaulova, E., Saunders, B.T., Grover, S.P., Cleuren, A.C., Broze, G.J., Edelson, B.T., Mackman, N., Zinselmeyer, B.H., Randolph, G.J., 2019. Expression of factor V by resident macrophages boosts host defense in the peritoneal cavity. *J. Exp. Med.* **216**, 1291–1300.

ANEXOS

Tabla 1. Expresión diferencial de marcadores fenotípicos en LPMs y SPMS.

Molécula	LPMs	SPMs	Referencia
F4/80	+	-	(Ghosn et al., 2010; Okabe and Medzhitov, 2014)
MHC-II	-	+	(Ghosn et al., 2010; Okabe and Medzhitov, 2014)
CD11b	+	+	(Ghosn et al., 2010; Okabe and Medzhitov, 2014)
ICAM-2	+	-	(Okabe and Medzhitov, 2014)
TIM4	+	-	(Bain et al., 2016)
MERTK	+	-	(Nishi et al., 2014; Liao et al., 2016)
Gata6	+	-	(Gautier et al., 2014; Okabe and Medzhitov, 2014)
CD64	+	-	(Liao et al., 2016)
CCR2	-	+	(Liao et al., 2016)
CD206	-	+	(Cain et al., 2013; Bain et al., 2016; Liao et al., 2016)
CD115	+	+	(Cain et al., 2013; Liao et al., 2016)
CD80	+	+	(Cain et al., 2013; Liao et al., 2016)
CD86	+	+	(Cain et al., 2013; Liao et al., 2016)
Ly6c	-	-	(Bain et al., 2016; Liao et al., 2016)
CD11c	-	+/-	(Gautier et al., 2013)
CD93	+	-	(Cain et al., 2013)

Tabla 2A. Listado de anticuerpos utilizados para citometría de flujo.

Especificidad	Molécula conjugada	Clon	Especie	Procedencia
CD16/32 (FcγRII/III)		2.4G2	Rata	(*)
MHC-II	biotina/FITC/APC	FD11/2G9	Rata	(*)/BD/BD
F4/80	biotina	C1.A3.1	Rata	(*)
Ly6C	biotina/FITC	AL-21	Rata	(*)
Ly6G	PE	1A8	Rata	BD
CD90.2 (Thy1.2)	PE	53-2.1	Rata	BD
CD19	PE	1D3	Rata	BD
Ly6C	biotina/FITC	Monts-1/AL-21	Rata	(*)
CD11b	PeCy7	M1/70	Rata	Biolegend
CD11c	APC-Cy7	HL3	Hámster	BD
CD45	PB	30-F11	Rata	Biolegend
TIM-4	BV-421 / PE	21H12/ RMT4-54	Rata	BD/ Biolegend
Gata6	PE	D61E4	Conejo	Cell signalling
Control Gata6	PE	DA1E	Conejo	Cell signalling
Estreptavidina	PerCP			BD
Estreptavidina	APC-Cy7			BD

(*) anticuerpos procedentes de hibridomas cultivados en el laboratorio.

Tabla 2B. Listado de anticuerpos utilizados para microscopía confocal.

Especificidad	Molécula conjugada	Clon	Especie	Procedencia
F4/80	Biotina/ Alexa Fluor® 594	C1.A3.1/ BM8	Rata	(*)/Biolegend
Podoplanina	Alexa Fluor® 488	8.1.1	Hámster	Biolegend
Ly6G	Alexa Fluor® 647	1A8	Rata	Biolegend
TIM-4	Alexa Fluor® 647	21H12	Rata	BD
ZO-1	Alexa Fluor® 594	ZO1-1A12	Ratón	Invitrogen
CD41	Alexa Fluor® 594	MWReg30	Rata	Biolegend
Cleaved-caspase 3	purificado	policlonal	Conejo	Cell Signalling
Anticuerpo secundario Anti-conejo	Cy5	policlonal	Cabra	
Ki67	Alexa Fluor® 594	B56	Ratón	BD
CD19	Alexa Fluor® 647	6D5	Rata	Biolegend
Estreptavidina	Cy3/Cy5			Jackson

(*) anticuerpos procedentes de hibridomas cultivados en el laboratorio.